

**IN VITRO-TESTSYSTEME
ZUR IDENTIFIZIERUNG
GENTOXISCHER CHEMIKALIEN
IN DER UMWELT DES MENSCHEN:
DER NACHWEIS
DER DNA-REPARATURSYNTHESE
IN LEBERZELLEN**

Stephan Roßberger



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**IN VITRO-TESTSYSTEME ZUR IDENTIFIZIERUNG
GENTOXISCHER CHEMIKALIEN IN DER UMWELT DES MENSCHEN:
DER NACHWEIS DER DNA-REPARATURSYNTHESE IN LEBERZELLEN**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Stephan Roßberger
aus München**

1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. U Hagen
- Sondergutachter : Prof. Dr. H.Greim

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 1986

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. H. Greim in der Zeit von September 1982 bis Dezember 1985 am Institut für Toxikologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Greim, Herrn Dr. U. Andrae, Herrn Prof. Dr. Dr. Schwarzfischer und Herrn Prof. Dr. Dr. U. Hagen danke ich für die Betreuung bzw. Begutachtung dieser Arbeit.

Frau L. Vogl und Frau H. Homfeldt danke ich für die technische Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht:

Rossberger, S., Andrae, U.: DNA repair synthesis induced by N-hydroxyurea, acetohydroxamic acid and N-hydroxyurethane in primary rat hepatocyte cultures: comparative evaluation using the autoradiographic and the bromodeoxyuridine density-shift method. Mutation Res. 145, 201-207 (1985).

Ziegler-Skylakakis, K., Rossberger, S., Andrae, U.: Thiourea induces DNA repair synthesis in primary rat hepatocyte cultures and gene mutations in V79 Chinese hamster cells. Arch. Toxicol. 58, 5-9 (1985).

INHALT

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien	4
2.2.	Zellen	5
2.2.1.	Hepatozyten	5
2.2.2.	2sFou-Hepatomzellen	6
2.3.	Messung der DNA-Reparatur	6
2.3.1.	Gradientenzentrifugationsmethode	6
2.3.2.	Autoradiographische Methode	10
2.4.	Trennung replizierter und nicht replizierter doppelsträngiger DNA	12
2.5.	Trennung von mt-DNA und n-DNA	13
2.6.	Zellkernisolierung	14
2.7.	Mitochondrienfärbung	14
2.8.	Enzymbestimmungen	16
3.	ERGEBNISSE	19
3.1.	Bestimmung der DNA-Reparatur in Hepatozyten mit der Gradientenzentrifugationsmethode	19
3.1.1.	Überprüfung der Methodik	19
3.1.2.	Background-Reparatur in Hepatozyten	21
3.1.2.1.	Identifizierung des Background als DNA-Reparatur	21
3.1.2.2.	Ursachen der Background-Reparatur	24
3.1.2.2.1.	DNA-Schäden durch radioaktive Strahlung	25
3.1.2.2.2.	DNA-Schäden durch Kollagenase	27
3.1.2.3.	Möglichkeiten zur Reduzierung der Background-Reparatur	29
3.1.2.3.1.	Abtrennung replizierter doppelsträngiger DNA	30
3.1.2.3.2.	Verlängerung der Vorinkubation	34

3.2.	Bestimmung der DNA-Reparatur in Hepatozyten mit der autoradiographischen Methode	38
3.2.1.	Überprüfung der Methodik	38
3.2.2.	Silberkorn-Background über den Hepatozyten	40
3.3.	Vergleich der autoradiographischen und der Gradientenzentrifugationsmethode anhand ausgewählter Modellsubstanzen	44
3.3.1.	Der Nachweis stark wirksamer Substanzen: Dimethylnitrosamin als Positivkontrolle	46
3.3.2.	Der Nachweis schwach wirksamer Substanzen	47
3.3.2.1.	Aliphatische Hydroxamsäuren	48
3.3.2.2.	Thioharnstoff	50
3.4.	Wirkung von Hydroxyharnstoff auf die DNA-Synthese in Hepatozyten	54
3.5.	Untersuchung der differenzierten Ratten- hepatomzelllinie 2sFou auf ihre Einsetzbarkeit im DNA-Reparaturtest	62
3.5.1.	Überprüfung der Methodik	62
3.5.2.	Vergleich von 2sFou-Zellen und Hepatozyten	64
3.5.2.1.	Bestimmung der Monooxygenaseaktivität	64
3.5.2.2.	Bestimmung der Reparaturkapazität	65
3.5.2.3.	Induktion von DNA-Reparatur durch ausgewählte Modellsubstanzen	68
4.	DISKUSSION	74
5.	ZUSAMMENFASSUNG	82
6.	LITERATUR	84

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen:

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
AHA	Acetohydroxamsäure
BP	Benzo(a)pyren
BrdUrd	5-Bromdesoxyuridin
dCyd	Desoxycytidin
DEN	Diethylnitrosamin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMN	Dimethylnitrosamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dThd	Desoxythymidin
EBr	Ethidiumbromid
EGTA	Ethylenglykol-bis- β -aminoethyläther-N-N'- tetraessigsäure
FdUrd	5-Fluordesoxyuridin
FKS	fötales Kälberserum
HBSS	Hanks Salzlösung
HU	N-Hydroxyharnstoff
HUT	N-Hydroxyurethan
mt-DNA	mitochondriale DNA
n-DNA	Zellkern-DNA
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, reduziert
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylhydrogensulfat
TCA	Trichloressigsäure
TU	Thioharnstoff
WME	Williams Medium E

1. EINLEITUNG

Die Exposition des Menschen gegenüber Chemikalien steigt durch Neuentwicklung und weltweite industrielle Nutzung von chemischen Substanzen kontinuierlich an. Die Identifizierung einer Reihe in der Umwelt des Menschen weitverbreiteter Stoffe als mutagen oder kanzerogen (1) machte die Notwendigkeit deutlich, Substanzen routinemäßig auf mögliche gentoxische Wirkungen zu untersuchen. Benötigt wurden dazu Testsysteme, die schneller und kostensparender als Langzeitkanzerogenitätsstudien, zu zuverlässigen Ergebnissen führen. Es wurde daher in den letzten Jahren eine Vielzahl von in vitro-Testsystemen zur Erkennung mutagener Chemikalien in der Umwelt des Menschen etabliert (2). Dabei zeigte sich schon bald, daß ein zentrales Problem dieser Testsysteme in der Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung vieler Substanzen vom Zellmetabolismus liegt. Zahlreiche chemische Verbindungen reagieren nicht direkt mit der DNA, sondern erst nach enzymatischer Aktivierung zu reaktiven Metaboliten (3-5). Das wichtigste Enzymsystem für die Aktivierung von Mutagenen und Kanzerogenen ist dabei das mikrosomale Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenase-System, das in unterschiedlichen Formen in den verschiedenen Säugergeweben vorkommt. Die in der Mutagenitätstestung am häufigsten verwendeten Indikatororganismen, nämlich Bakterien, Hefen und Säugerzellen in Dauerkultur, enthalten jedoch entweder keine Monooxygenasen oder nur geringe Aktivitäten bestimmter extrahepatischer Formen. Leberspezifische Monooxygenasen fehlen grundsätzlich. Die Testchemikalien müssen daher extrazellulär durch bestimmte zugesetzte Leberfraktionen ("Mikrosomen", "S9-Mix"), die die entsprechenden Enzyme enthalten, aktiviert werden. Der Metabolismus dieser Aktivierungssysteme entspricht aber oft nicht dem intakter Zel-

len. Als Folge davon können Unterschiede in der Art der gebildeten Metabolite (6-8) und ihrer Addukte mit DNA (9) auftreten. Zusätzliche Probleme können sich auch aus der vergrößerten Entfernung zwischen dem Ort der Aktivierung und dem Wirkort der meist nur kurzlebigen reaktiven Metaboliten ergeben. Zur realistischen Abschätzung des genotoxischen Potentials einer Substanz waren deshalb Testsysteme erstrebenswert, bei denen die Metabolisierung der Testchemikalie in der Zelle erfolgt, in der auch der Effekt auf das genetische Material bestimmt wird.

Der DNA-Reparaturtest mit Primärkulturen von Rattenhepatozyten, der erstmals von Williams (10) beschrieben wurde, stellt den wohl vielversprechendsten Ansatz in dieser Richtung dar. Frisch isolierte Leberzellen enthalten hohe Aktivitäten der verschiedenen Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen (11,12) und sind daher zur Fremdstoffaktivierung optimal geeignet. Die Einwirkung gentoxischer Chemikalien auf die Zellen wird indirekt durch Bestimmung der DNA-Reparatur nachgewiesen, die als Folge einer DNA-Schädigung auftritt. Der gemessene biologische Endpunkt ist dabei weitgehend unabhängig von der Art des Schadens, so daß ein breites Spektrum gentoxischer Wirkungen erfaßt wird (13). Die Untersuchung einer großen Zahl strukturell verschiedener Kanzerogene auf die Induktion von DNA-Reparatur in Hepatozyten (10,14-18) ergab eine sehr gute Korrelation zwischen der Reparatur-induzierenden Wirkung einer Substanz und ihrem kanzerogenen Potential. Obwohl diese Ergebnisse die großen Möglichkeiten des Testsystems überzeugend demonstrieren, ist die Bestimmung der DNA-Reparatur in Hepatozyten nicht ohne Probleme. Ursache dafür ist vor allem die nicht ausreichende Charakterisierung der zur Verfügung stehenden Techniken.

Zur Zeit stehen zwei Testverfahren zur Verfügung, die für die DNA-Reparaturbestimmung in Hepatozyten geeignet erscheinen: Die autoradiographische Methode (10) und die Gradientenzentrifugationsmethode (19). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach Etablierung dieser Techniken ihre Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit zur Bestimmung Chemikalien-induzierter DNA-Reparatur systematisch zu überprüfen. Besonders berücksichtigt werden sollte dabei die Analyse von Faktoren, die den Reparaturnachweis beeinflussen und damit die Interpretierbarkeit der Ergebnisse einschränken können. Ferner sollten diese Untersuchungen zur methodischen Weiterentwicklung und Standardisierung des DNA-Reparaturtestsystems beitragen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob sich bestimmte Rattenhepatomzelllinien an Stelle der primären Hepatozyten im DNA-Reparaturtest einsetzen lassen. In jüngster Zeit sind einige Hepatomzelllinien bekannt geworden, die dem für den Fremdstoffmetabolismus notwendigen enzymatischen Spektrum einer differenzierten Leberzelle sehr nahe kommen (20). Als einzige bisher bekannte Zelllinien exprimieren sie auch leberspezifische Monooxygenasen (21,22). Die Verwendung der Hepatomzellen hätte den Vorteil, daß sie als kontinuierliche Zellkulturen gezüchtet werden können und nicht wie die Hepatozyten für jeden Versuch frisch isoliert werden müssen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien

Es wurde bezogen

- ^3H -dCyd (spez. Aktivität 18-25 Ci/mMol), L(4,5- ^3H)-Leucin (spez. Aktivität 160 Ci/mMol) von Amersham, Braunschweig;
- DMEM, Glutamin, Hams Fl2-Medium, HBSS, Penicillin/Streptomycin, PBS, Trypsin von Biochrom KG, Berlin;
- HU, NADPH, Proteinase K, Kollagenase von Boehringer, Mannheim;
- HUT von EGA, Steinheim;
- NCTC135 Medium, WME von Flow, Meckenheim;
- PKS von Gibco, Karlsruhe;
- Entwickler D19, Filmemulsion NTB 2, Fixiersalz von Kodak, Stuttgart
- Cs_2SO_4 p.a., Dodecylhydrogensulfat Na-Salz, Entellan und Mayers Hämalaunlösung von Merck Darmstadt;
- DEN, DMN von Merck-Schuchardt, Hohenbrunn;
- α -(methyl- ^3H)-Aminoisobuttersäure (spez. Aktivität 20 Ci/mMol) von New England Nuclear, Dreieich;
- Rhodamin 123 von Polysciences Ltd, St Goar;
- Aldrin von Riedel de Haen AG, Hannover;
- BP von Roth KG, Karlsruhe;
- 2-AAF, AHA, Benz(a)anthrazen, BrdUrd, Dexamethason, EGTA, Ethidiumbromid, FdUrd, Katalase von Sigma, München;
- CsCl (optisch rein), Na-Lauroylsarcosinat von Serva, Heidelberg;
- TU von SKW, Trostberg.

2.2. Zellen

2.2.1. Hepatozyten

Für die Präparation der Hepatozyten (nach 23) wurden männliche Wistar-Ratten (170-190 g Körpergewicht) verwendet. Die Ratten wurden mit Nembutal (50 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Die Bauchhöhle wurde geöffnet, die Leber freipräpariert, die Leberarterie wurde dann abgebunden und in der Pfortader eine Braunüle fixiert.

Perfundiert wurde mit 250 ml Ca^{2+} -freier HBSS mit 100 μM EGTA, dann mit 250 ml der gleichen Lösung ohne EGTA. Anschließend wurde mit 100 ml DMEM, das 0,05 mM Ca^{2+} und 60 mg Kollagenase (189 U/ml) enthielt, rezirkulierend weiterperfundiert. Nach etwa 15 min wurde die Glissonsche Kapsel der Leber entfernt, die Zellen wurden in DMEM suspendiert, dreimal zentrifugiert (2 min, 50 x g) und anschließend im Eisbad aufbewahrt. Für die weiteren Versuche wurden nur Hepatozytenpräparationen verwendet, in denen weniger als 20% der Zellen mit Trypanblau anfärbbar waren.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in 75 cm² Falcon-Flaschen. Sollten die Zellen mit UV-Licht bestrahlt werden, wurden sie in 100 mm Falcon-Gewebekulturschalen inkubiert. 6×10^6 Zellen wurden in 15 ml WME mit 10% FKS (30 min bei 50°C inaktiviert), Penicillin (100 E/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesät. Nach 1,5 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und Begasung mit 5% CO_2 /95% Luft wurde das Medium abgesaugt. Die angewachsenen Zellen wurden zweimal mit 5 ml HBSS (37°C) gewaschen.

2.2.2. 2sFou-Hepatomzellen

2sFou-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. F. Wiebel, Abteilung Toxikologie der GSF, Neuherberg, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie stammt von dem Reuber-Rattenhepatom-Klon H4IIEC3 (24,25) ab und wurde von Dr. M. Weiss (Centre de Genetique Moleculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, Frankreich) etabliert. Die Zellen wurden in 75 cm² Falcon-Flaschen oder in 100 mm Falcon-Gewebekulturschalen im Brutschrank bei 37°C und 7% CO₂/95% Luft gezüchtet. Das Kulturmedium (10 ml) bestand zu gleichen Teilen aus Ham's F12 und NCTC135-Medium und enthielt 5% FKS, Penicillin (100 E/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Zur Induktion der Monooxygenasen wurden dem Medium 32 h vor Versuchsbeginn Dexamethason (5 µM) und 18 h vor Versuchsbeginn Benz(a)anthracen (20 µM) zugesetzt. Dexamethason und Benz(a)anthracen wurden in Methanol bzw. DMSO gelöst. Die Lösungsmittelkonzentration im Medium betrug maximal 0,1%.

2.3. Messung der DNA-Reparatur

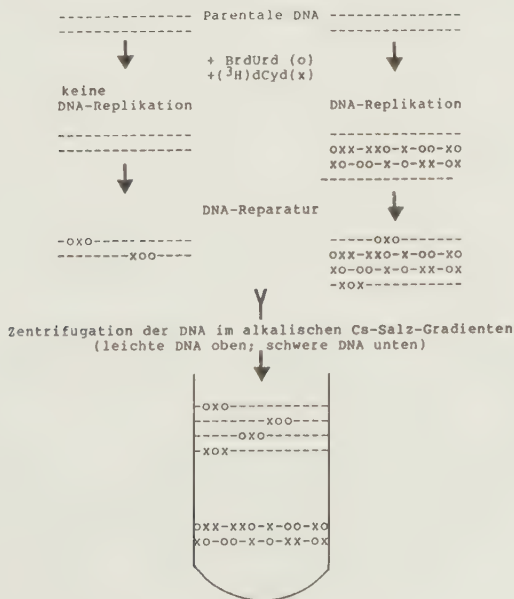
2.3.1. Gradientenzentrifugationsmethode (nach 19)

Prinzip

Bei dieser Methode werden reparierte und semikonservativ replizierte DNA-Stränge nach radioaktiver Markierung physikalisch-chemisch voneinander getrennt. Dazu werden die Zellen mit den Thymidinanalogen BrdUrd und FdUrd in Gegenwart eines radioaktiv markierten Desoxyribonukleotids, z.B. ³H-dThd oder ³H-dCyd, inkubiert. Durch den Einbau des schweren BrdUrd bei der replikativen DNA-Syn-

these werden die neusynthetisierten DNA-Stränge spezifisch schwerer als die nicht replizierten parentalen Stränge. FdUrd, ein Inhibitor der Thymidylatsynthetase, ermöglicht dabei durch die Reduzierung des dTTP-Pools der Zellen eine hohe BrdUrd-Dichtemarkierung der neusynthetisierten DNA. Bei der Exzisionsreparatur eingebautes BrdUrd reicht dagegen nicht zu einer Dichteänderung aus. Zentrifugiert man die DNA anschließend im alkalischen Cs-Salz-Gradienten, lassen sich die unterschiedlich dichten DNA-Einzelstränge trennen (Schema 1). Durch Messung der eingebauten Radioaktivität werden die beiden Arten der DNA-Synthese quantifiziert.

Schema 1 Prinzip der Gradientenzentrifugationsmethode



Durchführung

Primäre Hepatozytenkulturen oder 2sFou-Hepatomzellen wurden 1 h in 4 ml WME mit 40 μ M FdUrd und 200 μ M BrdUrd im Brutschrank vorinkubiert (37°C; 5% CO₂/95% Luft). Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden mit FdUrd (40 μ M), BrdUrd (200 μ M), der Testsubstanz (in Medium oder DMSO gelöst) und ³H-dCyd (10 μ Ci/ml) weiterinkubiert. Bei leicht flüchtigen Testsubstanzen wurden die Zellkulturflaschen luftdicht verschlossen. Die DMSO-Konzentration im Testansatz betrug 0,5%. Nach 18 h wurden die Zellen zweimal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und mit 3 ml 1%igem Na-Lauroylsarcosinat in Lysierpuffer (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,9) lysiert (30 min, 37°C). Nach Zugabe von 150 μ l Proteinase K-Lösung (1 mg/ml Lysierpuffer) wurden die Lysate 2 h bei 50°C in verschlossenen Röhrchen verdaut. Die DNA wurde mit 2,5 Volumina 0,1 M Kaliumacetat in Ethanol (-20°C) ausgefällt, abzentrifugiert, zweimal mit 3 ml Ethanol (-20 °C) gewaschen und bei Zimmertemperatur im Exsikkator getrocknet.

Das DNA-Pellet wurde in 5,1 ml CsCl/Cs₂SO₄-Lösung in 0,1 N NaOH (CsCl:Cs₂SO₄ = 4,8:1; Brechungsindex 1,3996-1,4000) gelöst und 1 min auf einem Reagenzglas-mischer bei maximaler Geschwindigkeit gemischt. 5,0 ml wurden in Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen (Beckman) pipettiert und in einem Beckman VTi 65-Vertikalrotor 16 h bei 48000 rpm und 20°C (Beckman L8-55M Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Um eine Überlagerung des Radioaktivitätspeaks der DNA normaler Dichte mit der dichtemarkierten replizierten DNA zu vermeiden, wurde in einem Rebanding-Schritt der größte Teil der replizierten DNA entfernt. Dazu wurden mit einer Hamilton-Spritze 2,5 ml des Gradienten vom Röhrchenboden entnommen. Zu den restlichen 2,5 ml wurden 2,5 ml CsCl/Cs₂SO₄-Lösung (0,1 N NaOH;

Brechungsindex 1,4010) gegeben und nochmals 16 h bei 50000 rpm und 20°C zentrifugiert.

Die Gradienten wurden mit einem halbautomatischen Fraktioniergerät (Auto-Densi-Flow II C, Buchler, USA) von oben in 4 Tropfen-Fraktionen fraktioniert. Jede Fraktion wurde mit 0,6 ml H₂O verdünnt und gemischt. 250 µl wurden abgenommen, nochmals mit 0,6 ml H₂O verdünnt, mit 20 µg Kalbsthymus-DNA in 1 ml H₂O versetzt und mit 2,5 ml 10%iger TCA gefällt. Die Proben wurden für 30 min in Eiswasser gestellt und anschließend durch Glasfaserfiltermatten (Flow, Meckenheim) mit einem "Zellsammler" (Flow) abgesaugt. Die Filter wurden dreimal mit 5 ml 5%igem Natriumpyrophosphat in 5%iger TCA nachgewaschen und 20 min bei 80°C getrocknet. Nach Ausstanzen in Szintillationsröhrchen (LKB-Minivials) und Zugabe von 2 ml Toluol-Szintillator wurde die säureunlösliche Radioaktivität auf den Filtern in einem Szintillationszähler (1216 Rackbeta, LKB, Gräfelfing) bestimmt.

In aliquoten Teilen der restlichen Flüssigkeit der Fraktionen wurde die Absorption bei 260 nm (A_{260}) im UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer, Überlingen) gemessen und anhand der Gesamtabsorption im UV-Peak durch Vergleich mit einer DNA-Eichkurve der DNA-Gehalt ermittelt. Zur Bestimmung der DNA-Reparatur wurde die, in die DNA mit normaler Dichte eingebaute, Radioaktivität berechnet und auf den DNA-Gehalt bezogen (cpm/µg DNA).

Die säureunlösliche Radioaktivität der 2,5 ml, die nach dem ersten Zentrifugenlauf vom Gradienten abgenommen worden waren (dichtemarkierte replizierte DNA), wurde ebenfalls bestimmt. Zusammen mit der noch im Gradienten verbliebenen Radioaktivität im dichten Peak konnte daraus die replikative DNA-Synthese (cpm/µg DNA) ermittelt werden.

2.3.2. Autoradiographische Methode (nach 10)

Prinzip

Bei dieser Methode wird die Reparatur autoradiographisch als Einbau von radioaktiven DNA-Vorstufen in Kerne von Zellen, die sich nicht in der DNA-Synthese-Phase des Zellzyklus (S-Phase) befinden, bestimmt. Die Zellen werden mit einem ^3H -markierten Desoxyribonukleosid inkubiert, das bei DNA-Replikation und DNA-Reparatur in die DNA eingebaut wird. Nach Überschichten der Zellen mit einer Filmemulsion lassen sich die radioaktiven Zerfälle des ^3H anhand der Schwärzung der Filmschicht in Form von Silberkörnern sichtbar machen. Die Zellkerne von S-Phase-Zellen mit replizierter DNA sind wegen ihrer hohen Silberkorndichte leicht zu erkennen. Die Zahl der Silberkörner über den übrigen Kernen wird als Kriterium für die Induktion von DNA-Reparatur durch gentoxische Substanzen ("unscheduled DNA synthesis", UDS) verwendet.

Durchführung

In Zellkulturplatten mit 12 Fächern (Costar, Cambridge, USA) wurden Kunststoff-Plättchen (15 mm ϕ -Thermanox Co-verslips, Lux) gelegt und darauf jeweils 2×10^5 Hepatozyten in 1 ml WME mit 10% FKS verteilt. Nach 1,5 h Inkubation im Brutschrank wurden die angewachsenen Zellen zweimal mit 1 ml vorgewärmter HBSS gewaschen und in WME, nach Zugabe der in Medium oder DMSO gelösten Testsubstanz und ^3H -dCyd (10 $\mu\text{Ci/ml}$), weiterinkubiert. 18 h später wurden die Zellen dreimal mit vorgewärmter HBSS gewaschen. Mit einer Pinzette wurden die Plastikplättchen mit den angewachsenen Zellen aus den Fächern genommen, dreimal in ein Becherglas mit HBSS getaucht und in neue Kulturplatten überführt. Die Zellen wurden zur Vergrößerung der Zellkerne 8 min mit hypotonischer Citrat-Lösung (1% Na-Citrat in H_2O) behandelt und in Essig-

säure-Ethanol (1:3) fixiert. Die Fixierlösung wurde zweimal nach jeweils 30 min erneuert. Nach kurzer Behandlung (ca. 30 sec) mit 90%igem Ethanol wurden die Kunststoffscheiben mit einem Einbettungsmittel (Entellan) auf Objektträger geklebt (Seite mit Zellen nach oben) und etwa 2 Tage staubfrei getrocknet.

Die Objektträger wurden bei 43°C (Wasserbad) ohne Dunkelkammerbeleuchtung mit Filmemulsion (Kodak NTB 2, 1:1 mit H₂O verdünnt) überschichtet und für 8 Tage in einem lichtdichten, mit Blaugel gefüllten, Aluminiumbehälter bei 4°C exponiert. Die Autoradiographien wurden bei 15°C 4 min entwickelt (Kodak, D19), 8 min fixiert und gründlich mit Leitungswasser und H₂O dest. gespült. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Präparate mit Meyers Hämalaun 80 sec inkubiert.

Auswertung

Auf jedem Kunststoffplättchen wurden die von Silberkörnern gebildeten Flächen über mindestens 25 Zellkernen und jeweils drei, dem Kern benachbarten, kerngroßen Cytoplasmabereichen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit einem am Mikroskop angeschlossenen automatischen Zählgerät (Artek Counter 880). Bei diesem Verfahren wird das mikroskopische Bild mit einer Videokamera auf einen Bildschirm übertragen. Der Counter ist dann in der Lage, aufgrund von Kontrastunterschieden Schwärzungspunkte oder -flächen in am Bildschirm einstellbaren Bereichen zu erkennen und zahlenmäßig zu erfassen. Da eng zusammenliegende oder überlappende Silberkörner vom Gerät nicht getrennt analysiert werden (§Lit. Kraemer), wurde nicht die Zahl der Silberkörner, sondern die von den Silberkörnern bedeckte Fläche (Schwärzungsfläche) bestimmt. Zur Umrechnung in Silberkörner wurde die Fläche einzelner Silberkörner bestimmt und der Umrechnungsfaktor ermittelt. Einer relativen Flächeneinheit entsprachen meist 2-2,5 Silberkörner. Pyknotische Zellkerne, extrem große oder kleine Kerne und

eng zusammenliegende Zellen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Um die Auswertung möglichst objektiv zu gestalten, waren die Objektträger kodiert.

Aus den Mittelwerten

- der Schwärzungsfläche über den Zellkernen,
- der Schwärzungsfläche über kerngroßen Cytoplasmaarealen und
- der Differenz der Silberkornzahl über Kern und Cytoplasma (Netto Silberkornzahl/Kern)

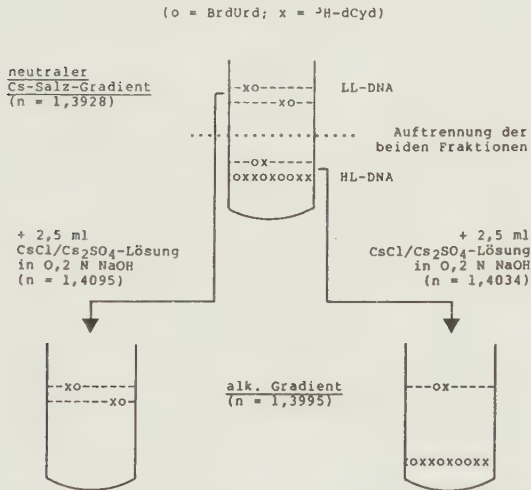
dreier gleich behandelter Kunststoffplättchen wurde erneut der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt. Für die statistische Auswertung wurde der Student T-Test verwendet.

2.4. Trennung replizierter und nicht replizierter doppelsträngiger DNA

Für einige experimentelle Fragestellungen war es erforderlich, den nativen doppelsträngigen Zustand der DNA während der Gradientenzentrifugation zu erhalten. Da unter den zur Reparaturmessung angewandten alkalischen Bedingungen die DNA in Einzelstränge getrennt wird, war eine Modifizierung der Methode notwendig. Dazu wurde in Anschluß an die Isolierung der DNA (vgl.2.3.) das DNA-Pellet in 4,1 ml Lysierpuffer (vgl.2.3.1.) gelöst und nach Zugabe von CsCl und Cs_2SO_4 (Verhältnis 4,8:1) der Brechungsindex auf 1,3928 eingestellt. Zentrifugation und Aufarbeitung erfolgten anschließend entsprechend der in 2.3.1. beschriebenen Methode.

Die Trennung der doppelsträngigen, in einem Strang mit BrdUrd dichtemarkierten Hybrid-DNA (HL-DNA) von der doppelsträngigen leichten DNA (LL-DNA) im neutralen Gradienten und die nachfolgende Bestimmung der DNA-Reparatur im alkalischen Gradienten (vgl.2.3.1.) wurde nach dem im Schema 2 gezeigten Verfahren durchgeführt.

Schema 2 Prinzip der Auftrennung replizierter (HL) und nicht replizierter (LL) doppelsträngiger n-DNA von Hepatozyten und die Bestimmung der DNA-Reparatur im Cs-Salz-Gradienten



2.5. Trennung von mt-DNA und n-DNA (nach 26)

Prinzip

Der Farbstoff Ethidiumbromid (EBr) interkaliert in doppelsträngige DNA und bewirkt durch Auflösung der Helix-Struktur eine Verringerung der DNA-Dichte. In ringförmig geschlossenen DNA-Molekülen, wie der mt-DNA, bleibt im Gegensatz zur offenen n-DNA die Verdrehung der beiden Stränge erhalten. Es kann daher weniger EBr interkalieren und die Abnahme der Dichte ist geringer als in der offenen DNA. Der Dichteunterschied von mt-DNA und n-DNA ermöglicht ihre Auftrennung durch Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten.

Durchführung

Die Zellen wurden wie üblich (vgl.2.3.1.), jedoch ohne Zugabe von BrdUrd und PdUrd, inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml PBS wurden die Zellen von den Kulturschalen abgeschabt und durch Zentrifugation gesammelt (Heraeus Minifuge; 1000 rpm; 5 min; 4°C). Nach Zugabe von 3 ml Lysierpuffer mit 0,6%igem SDS wurden die Zellen 30 min bei 37°C und nach Zugabe von 150 µl Proteinase K (1 mg/ml) weitere 2 h bei 40°C inkubiert. Zur Entfernung des SDS wurden anschließend langsam 500 µl einer 7 M CsCl-Lösung in Lysierpuffer zugegeben und die Röhrchen für 10 min in Eiswasser gestellt. Das entstandene Cs-SDS-Protein-Pellet (27) wurde abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SE 12-Rotor, 15000-16000 rpm, 15 min, 4°C) und verworfen. Zu 3,6 ml des Überstandes wurden 300 µl EBr-Lösung (2,5 mg/ml Lysierpuffer) pipettiert. Die Lösungen wurden etwa 30 min in einem sich sehr langsam drehenden Röhrchenhalter gemischt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Dann wurden 3,4 g festes CsCl zugegeben und der Brechungsindex auf 1,3890 eingestellt. 5 ml wurden in Zentrifugenröhrchen pipettiert und in einem VTi-65-Rotor (Beckman) zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, 45000 rpm, 20 h, 20°C). Die Gradienten wurde in 3 Tropfen-Fraktionen geteilt. Nach Verdünnung der Fraktionen mit 600 µl H₂O wurde die eingebaute Radioaktivität bestimmt (vgl. Aufarbeitung der Gradienten in 2.3.1.).

Da EBr die photometrische Bestimmung der DNA-Menge (A_{260} , vgl.2.3.1.) stört, konnte mit dem EBr-Gradienten nur das Verhältnis der radioaktiven Markierung von n-DNA zu mt-DNA bestimmt werden. Um Änderungen der spezifischen Markierung der n-DNA bzw. mt-DNA nachweisen zu können, wurden die nach der Inkubation gesammelten Zellen geteilt und parallel zu dem EBr-Gradienten in einem neutralen Gradienten (vgl.2.4.) die Gesamt-Radioaktivität der DNA und die DNA-Menge bestimmt.

2.6. Zellkernisolierung (nach 28,29)

Nach der Inkubation (vgl.2.3.1.) wurden die Zellen zweimal mit je 5 ml kaltem PBS gewaschen, von der Kulturplatte abgeschabt und als Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Sammeln der Zellen durch Zentrifugation (Heraeus Minifuge, 1000 rpm, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 900 µl hypotonischem Puffer (10 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 8) suspendiert und 10 min in Eiswasser inkubiert. Die Zellen wurden dann 15 sec homogenisiert (Ultra-Turrax TP 18-10; maximale Geschwindigkeit). Nach Zugabe von 100 µl Triton X-100 (10%ig in hypotonischem Puffer) und 5 min Inkubation in Eiswasser wurde das Homogenisieren wiederholt. Das Homogenat wurde bei 90 x g abzentrifugiert (Heraeus Minifuge, 750 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 1 ml Saccharoselösung (250 mM Saccharose in 50 mM Tris/HCl, 25 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 1 ml einer 880 mM Saccharose-Lösung unterschichtet und bei 850 x g zentrifugiert (Heraeus Minifuge; 2300 rpm, 10 min; 4°C). Die isolierten Kerne befanden sich im Pellet. Die Reinheit des Kern-Pellets wurde mikroskopisch geprüft.

2.7. Mitochondrienfärbung (nach 30)

Prinzip

Rhodamin 123 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch an Mitochondrien lebender Zellen anlagert. Wahrscheinlich wird der bei physiologischem pH positiv geladene Farbstoff durch das hohe negative Potential der Mitochondrienmembran gebunden (30).

Durchführung

Die Stammlösung (1 mg Rhodamin 123/ml H₂O) wurde im Verhältnis 1:100 mit WME verdünnt. Die entsprechend 2.3.2. auf Kunststoff-Plättchen angewachsenen Hepatozyten wurden mit dieser Lösung 30 min im Brutschrank inkubiert, dreimal mit vorgewärmter HBSS gewaschen und 10 min mit HBSS im Brutschrank nachinkubiert. Die Fluoreszenz von Rhodamin 123 wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm im Fluoreszenzmikroskop (Optiphot, Nikon) sichtbar gemacht. Zur photographischen Dokumentation wurde ein Kodak Ektachrom 400 Film verwendet.

2.8. Enzymbestimmungen

Zur Bestimmung Cytochrom P-450- und P-448-abhängiger Monooxygenasen in 2sFou-Zellen wurden die Aktivitäten der Aldrinepoxidase und der Benzpyrenhydroxylase gemessen.

Vorbehandlung der Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen, von der Kulturplatte abgeschabt, durch Zentrifugation (Heraeus Minifuge, 1000 rpm, 5 min, 4°C) gesammelt und bei -70 °C eingefroren.

Die Proteinbestimmung zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte nach Lowry (31).

Bestimmung der Aldrinepoxidase

Prinzip



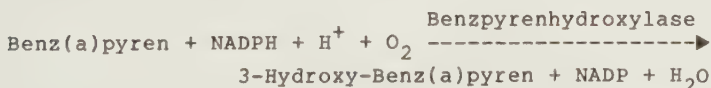
Dieldrin kann gaschromatographisch bestimmt werden.

Durchführung (nach 21,32)

Die eingefrorenen Zellen (10-100 μ g Zellprotein) wurden in 100 μ l 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) suspendiert. Anschließend wurden 25 μ l 200 mM Tris/HCl, 6 μ l 0,1 M $MgCl_2$, 59 μ l H_2O , 0,1 mg NADPH und 10 μ l 200 μ M Aldrin zugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert (Endkonzentration der Substanzen: 50 mM Tris/HCl, 3 mM $MgCl_2$, 0,6 μ M NADPH, 10 μ M Aldrin). Die Reaktion wurde durch Zugabe von n-Hexan gestoppt. Nach dem Ausschütteln des Ansatzes wurde das Dieldrin in der Hexanphase gaschromatographisch bestimmt (Hewlett-Packard 5700 A; Glassäule, 2mm ϕ , 2m, 3% XE-60 auf Chromosorb W(AW-DMCS), Trägergas Argon-Methan 90:10; 200°C).

Bestimmung der Benzpyrenhydroxylase

Prinzip



3-Hydroxy-Benz(a)pyren kann fluorimetrisch bestimmt werden.

Durchführung (nach 33,34)

Die eingefrorenen Zellen wurden in 0,5 ml 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) aufgenommen, mit 125 μ l 0,2 M Tris/HCl, 30 μ l 0,1 M $MgCl_2$, 295 μ l H_2O , 0,5 mg NADPH und 50 μ l 0,002 M Benz(a)pyren (in Methanol) versetzt und im Wasserbad (37°C) 60 min unter Schütteln inkubiert (Endkonzentration der Substanzen: 50 μ M Tris/HCl; 5 μ M $MgCl_2$; 0,6 μ M NADPH, 100 nM Benz(a)pyren). Die Reaktion wurde mit 4 ml kaltem Propanol-Hexan (1:3) gestoppt. Nach Klärung der Phasen wurden aus der oberen wäßrigen Phase 2 ml abgenommen und zu 1 ml 1 N NaOH

gegeben. Die Fluoreszenz des 3-Hydroxybenz(a)pyren wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 382 nm und Emissionswellenlänge von 522 nm gemessen (Fluorimeter Shimadzu UV 200).

3. ERGEBNISSE

3.1. Bestimmung der DNA-Reparatur in Hepatozyten mit der Gradientenzentrifugationsmethode

Die im folgenden angewandte Methode beruht auf der physikalisch-chemischen Trennung reparierter DNA von BrdUrd-dichte-markierter, replizierter DNA durch Gleichgewichtszentrifugation im Cs-Salz-Gradienten. Entwickelt wurde diese Technik von Pettijohn und Hanawalt (35) zum Nachweis der Exzisionsreparatur geschädigter DNA in UV-bestrahlten Bakterien. Für die Anwendung auf isolierte Hepatozyten wurde dieses Verfahren von Andrae und Schwarz (19) modifiziert.

3.1.1. Überprüfung der Methodik

Abb.1 zeigt ein typisches Gradientenprofil der DNA von Hepatozyten, die 18 h in Gegenwart von FdUrd, BrdUrd und ^3H -dCyd mit 10 mM DMN behandelt wurden (vgl.2.3.1.). Der Gipfel der Absorptionskurve (A_{260}) kennzeichnet die Position der parentalen, nicht BrdUrd-dichtemarkierten DNA-Stränge im Gradienten. Der mit dem UV-Absorptionspeak zusammenfallende Radioaktivitätspeak ist auf den Einbau von ^3H -dCyd in parentale DNA zurückzuführen und damit ein Maß für die DNA-Reparatur. Die Gleichgewichtslage replizierter BrdUrd-dichtemarkierter DNA-Stränge läßt sich nur am Radioaktivitätspeak im dichten Bereich des Gradienten ersehen. Die Menge an neureplizierter DNA ist in primären Hepatozytenkulturen zu gering, um in der UV-Absorptionskurve als Peak sichtbar zu werden. Der Background der Absorptionskurve ist auf die Absorption der unter alkalischen Bedingungen in Ribonukleotide abgebauten

ten RNA zurückzuführen, die sich gleichmäßig über den Gradienten verteilen.

Bei kleinen Reparatureffekten oder bei höheren DNA-Konzentrationen im Gradienten ist eine Überlagerung der Radioaktivitätsprofile von reparierter und replizierter DNA

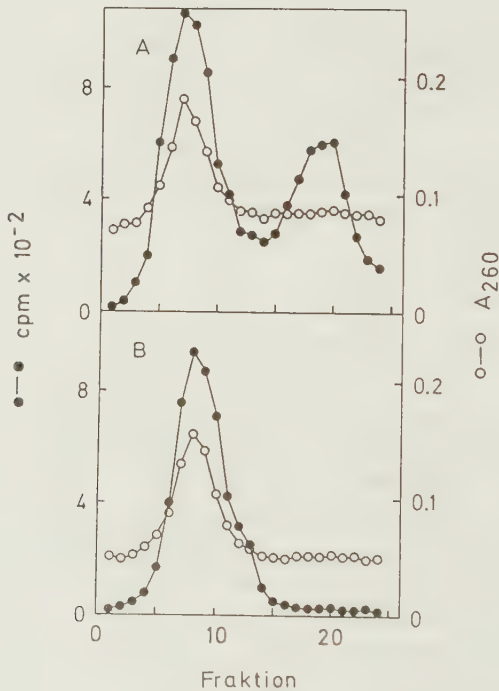


Abb.1 Gradientenprofile der DNA von DMN-behandelten Hepatozyten

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) mit 10 mM DMN inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend 2.3.1. Die Dichte im Gradienten steigt von links nach rechts.

A: Profil nach der ersten Zentrifugation, B: Profil nach dem Rebandschritt

möglich. Deshalb wurden die leichten, parentalen DNA-Stränge grundsätzlich in einem zweiten Zentrifugationslauf (Reband) gereinigt (vgl. 2.3.1.). Wegen der starken Induktion von DNA-Reparatur und gleichzeitigen Hemmung der replikativen DNA-Synthese durch DMN geht die Notwendigkeit des Rebands aus Abb.1 nicht eindeutig hervor. Der Reband-Effekt läßt sich aber am Gradientenprofil in Abb.1B gut erkennen. Die radioaktiv markierte replizierte DNA ist aus dem Gradienten entfernt und die durch Reparatur eingebaute Radioaktivität erscheint als diskreter Peak (Fraktion 5-15), der eine eindeutige Quantifizierung der DNA-Reparatur ermöglicht.

3.1.2. Background-Reparatur in Hepatozyten

Überraschenderweise ist auch in den Gradientenprofilen der DNA von Hepatozyten, die nicht mit einer gentoxischen Substanz behandelt wurden, also in Kontrollansätzen, ein deutlicher Radioaktivitätsgipfel im Bereich der nicht replizierten DNA zu erkennen (Abb.2). Um zu klären, ob dieser Radioaktivitätseinbau tatsächlich auf Reparatur in den Kontrollansätzen zurückgeführt werden kann oder methodisch bedingte Ursachen hat, wurde eine Reihe von Kontrollversuchen durchgeführt.

3.1.2.1. Identifizierung des Background als DNA-Reparatur

Der Radioaktivitätspeak im Bereich der leichten DNA tritt als deutlich von der dichtemarkierten DNA getrennte Bande auf und ist auch nach dem Reband-Schritt gegenüber der UV-Absorptionskurve nicht in den dichten Bereich des Gra-

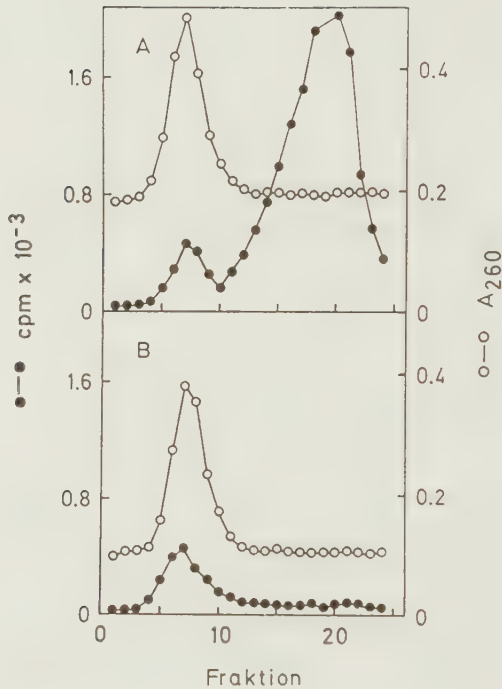


Abb.2 Gradientenprofile der DNA von unbehandelten Hepatozyten

Versuchsdurchführung vgl. Legende Abb.1

A: Profil nach der ersten Zentrifugation, B: Profil nach dem Rebandschritt

dienten verschoben (Abb.2A,B).

Außerdem kann die Position der Radioaktivitätsbande und die spezifische Aktivität der parentalen DNA durch Verlängerung der Inkubationszeit mit FdUrd und BrdUrd (Tab.1) oder durch eine Erhöhung der FdUrd- und BrdUrd-Konzentration nicht verändert werden (Tab.2). Die Mög-

Tabelle 1 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität parentaler DNA von der Vor- und Nachinkubation der Hepatozyten mit FdUrd und BrdUrd

Vor- bzw. Nachinkubation mit FdUrd und BrdUrd	spezifische Aktivität cpm/ μ g DNA
1 h Vorinkubation	81,4
2 h Vorinkubation	82,6
1 h Vorinkubation + 2 h Nachinkubation	86,8
2 h Vorinkubation + 2 h Nachinkubation	83,0

Die Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 20 μ M FdUrd und 200 μ M BrdUrd vorinkubiert und nach einem Medienwechsel 18 h mit 20 μ M FdUrd, 200 μ M BrdUrd und ^3H -dCyd (10 μ Ci/ml; 18 Ci/mMol) weiterinkubiert. Für die Nachinkubation wurden die Zellen nach der 18 h-Inkubation zweimal mit PBS gewaschen und erneut mit FdUrd und BrdUrd inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.1. Jedes Meßergebnis stellt den Mittelwert aus zwei Experimenten dar.

Tabelle 2 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität parentaler DNA von der FdUrd- bzw. BrdUrd-Konzentration im Medium

Konzentration	spezifische Aktivität cpm/ μ g DNA
20 μ M FdUrd + 100 μ M BrdUrd	82,0
20 μ M FdUrd + 200 μ M BrdUrd	81,4
20 μ M FdUrd + 400 μ M BrdUrd	83,3
40 μ M FdUrd + 200 μ M BrdUrd	77,2

Die Zellen wurden mit FdUrd und BrdUrd 1 h vorinkubiert und nach einem Medienwechsel 18 h mit FdUrd, BrdUrd (in den angegebenen Konzentrationen) und ^3H -dCyd (10 μ Ci/ml; 18 Ci/mMol) inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.1. Jedes Meßergebnis stellt den Mittelwert aus zwei Experimenten dar.

lichkeit einer ungenügenden BrdUrd-Dichtemarkierung semi-konservativ replizierter, ^3H -dCyd-markierter DNA konnte daher als Ursache für den Radioaktivitätspeak im Bereich der leichten DNA ausgeschlossen werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Anwesenheit hoher Cs-Salz-Konzentrationen die vollständige Dissoziation der DNA beim Lösen in 0,1 N NaOH verhindert und durch Replikation markierte Hybrid-DNA in den leichten DNA-Peak gelangt. Dabei zeigte sich, daß die spezifische Aktivität der parentalen DNA auch erhalten bleibt, wenn das DNA-Pellet zuerst in 0,1 N NaOH gelöst und anschließend die Cs-Salze zugegeben werden. Die Möglichkeit einer unvollständigen Dissoziation der DNA in Gegenwart hoher Cs-Salz-Konzentrationen ist daher nicht gegeben.

Die radioaktive Markierung der parentalen DNA muß demzufolge auch in Kontrollansätzen auf den Einbau von ^3H -dCyd durch DNA-Reparatur zurückgeführt werden. Im folgenden wurde versucht, die auslösenden Faktoren dieser Background-Reparatur zu identifizieren.

3.1.2.2. Ursachen der Background-Reparatur

Die Inkubation von Hepatozyten in anderen Kulturmedien (MEM, Waymouth) als dem üblicherweise verwendeten WME führte zu keiner Änderung der Background-Reparatur. Auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Medium als Auslöser für die Background-Reparatur ist weitgehend auszuschließen, da die Zugabe des $\text{OH}^\bullet$ -Radikalfängers Mannitol (10 mM) oder die Zugabe von Katalase (500 U/ml) zum Medium die Background-Reparatur nicht reduziert (nicht gezeigt). Als weitere mögliche Ursachen für die Induktion von DNA-Schäden in Kontrollkulturen wurden im folgenden untersucht:

- die radioaktive Strahlung, die beim ^3H -Zerfall des zur DNA-Markierung verwendeten ^3H -dCyd auftritt, und
- die Wirkung der zur Hepatozytenisolierung verwendeten Kollagenase.

3.1.2.2.1. DNA-Schäden durch radioaktive Strahlung

Um den Einbau weniger Nukleotide durch Reparatursynthese mit genügend hoher Empfindlichkeit messen zu können, müssen den Zellen ^3H -markierte Desoxyribonukleoside in hoher Radioaktivität ($10 \mu\text{Ci/ml}$) als DNA-Vorstufen zur Verfügung gestellt werden. Da die beim ^3H -Zerfall freigesetzten Elektronen DNA-Schäden induzieren können (36-39), wurde untersucht, ob die β -Strahlung eine mögliche Ursache der Background-Reparatur sein könnte.

Hepatozytenkulturen wurden in Gegenwart von ^3H -dCyd ($10 \mu\text{Ci/ml}$) mit steigenden Aktivitäten von ^3H -Leucin und ^3H - α -Aminoisobuttersäure inkubiert. Anschließend wurde die induzierte DNA-Reparatur bestimmt. Die beiden Substanzen wurden ausgewählt, da sie in die Zellen aufgenommen werden und anzunehmen ist, daß sie in unmarkierter Form nicht gentoxisch sind und den DNA-Metabolismus nicht beeinflussen. ^3H -Leucin wird in Proteine eingebaut, ^3H - α -Aminoisobuttersäure wird auf Grund ihrer Konformation nicht metabolisiert (40). Wie in Abb.3 dargestellt, induzieren beide radioaktiv markierten Verbindungen in Abhängigkeit von der Radioaktivität einen Anstieg der Background-Reparatur um maximal 40%. In Kontrollansätzen, die nur ^3H -Leucin oder ^3H - α -Aminoisobuttersäure und kein ^3H -dCyd enthielten war die DNA nicht radioaktiv markiert. Damit konnte ein denkbarer ^3H -Austausch oder andere unspezifische Effekte als Ursache der Erhöhung ausgeschlossen werden. Ebenso führten die unmarkierten Verbindungen im gleichen Konzentrationsbereich zu keiner Erhöhung der Background-Reparatur (nicht gezeigt). Die deut-

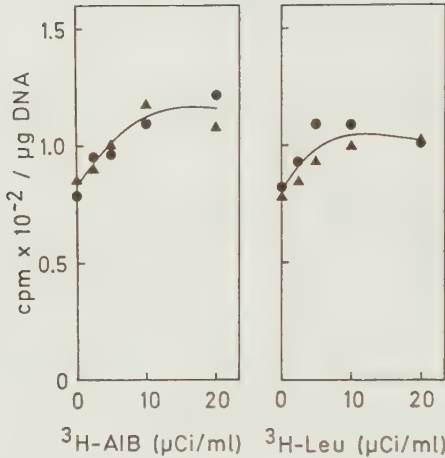


Abb.3 DNA-Reparatur in Hepatozyten nach Behandlung mit ³H-Aminoisobuttersäure und ³H-Leucin

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) mit ³H-AIB oder ³H-Leu inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.1. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

liche Abflachung der beiden in Abb.3 gezeigten Reparaturkurven bei 20 µCi/ml beruht wahrscheinlich auf cytotoxischen Effekten der ³H-Strahlung, denn die replikative DNA-Synthese war bei dieser ³H-Aktivität gegenüber der Kontrolle bereits um 30-40% erniedrigt (nicht gezeigt).

Die Experimente lassen den Schluß zu, daß auch ³H-dCyd in der für die ³H-Markierung der DNA verwendeten spezifischen Aktivität von 10 µCi/ml DNA-Reparatur auslösen kann. Die strahleninduzierte Reparatur ist allerdings zu gering, um als einzige Ursache für die Background-Reparatur in Frage zu kommen.

3.1.2.2.2. DNA-Schäden durch Kollagenase

Als weiterer möglicher Faktor bei der Auslösung der Background-Reparatur in Hepatozyten wurde die Kollagenase-Behandlung der Hepatozyten bei der Leberperfusion untersucht. Kollagenase wird in einer Aktivität von 100 U/ml zur Auflösung interzellulärer Kollagenschichten verwendet (vgl. 2.2.1.). Sie wird von Hepatozyten ins Cytoplasma aufgenommen, ist dort mindestens 24 h nachweisbar und proteolytisch aktiv (41,42) und kann zu DNA-Strangbrüchen führen (43).

Um zu klären, ob in die Zellen aufgenommene Kollagenase zur Background-Reparatur beitragen kann, wurden Hepatozyten 18 h mit verschiedenen Kollagenaseaktivitäten inkubiert. Da die Kollagenase in höheren Konzentrationen einen Teil der Hepatozyten von den Kulturschalen ablöste, wurden bei Versuchsende die im Medium schwimmenden Zellen gesammelt und getrennt von den angewachsenen Zellen weiterverarbeitet. Bei Kollagenaseaktivitäten von 0,1 und 1 U/ml ist sowohl in Hepatozyten, die bei Versuchsende noch angewachsen waren, als auch in den abgeschwommenen Zellen ein leichter Anstieg der DNA-Reparatur zu erkennen (Abb. 4A,C). Eine weitere Erhöhung der zugegebenen Enzymaktivität (10-100 U/ml) führte zur vollständigen Ablösung der Zellen von der Kulturplatte und zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Reparatur auf das drei- bis vierfache der Kontrolle. Die Werte für die Background-Reparatur in abgelösten (aus drei Ansätzen gepoolten) und angewachsenen Zellen von Kontrollansätzen sind identisch (Abb. 4A). Das deutet darauf hin, daß die Induktion von DNA-Reparatur nicht eine zwangsläufige Folge der Ablösung der Zellen von der Platte ist und nicht auf einer unspezifischen cytotoxischen Wirkung des Enzyms beruht.

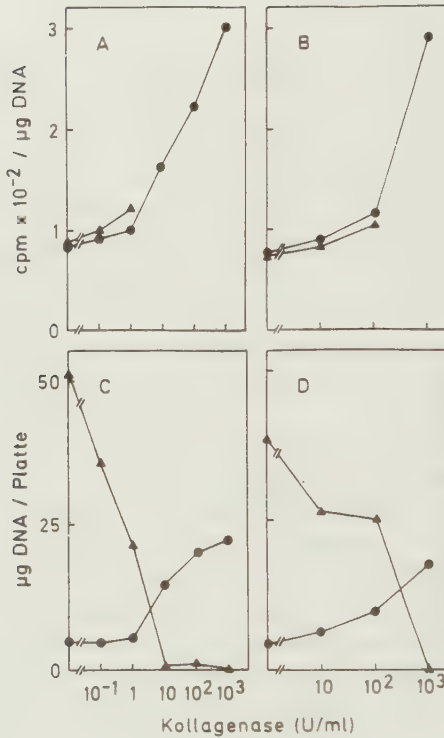


Abb.4 DNA-Reparatur und DNA-Gehalt in Hepatozyten-kulturen nach Behandlung mit Kollagenase

A,B: DNA-Reparatur nach 18 h (A) und 30 min (B) Kollagenasebehandlung

C,D: DNA-Gehalt/Platte nach 18 h (C) und 30 min (D) Kollagenasebehandlung

A,C: Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) mit Kollagenase inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen (●-●) dekantiert, durch Zentrifugation gesammelt und getrennt von den auf der Platte angewachsenen Zellen (▲-▲) aufgearbeitet. Die Bestimmung der DNA-Reparatur (A) erfolgte entsprechend 2.3.1. Der DNA-Gehalt (C) wurde durch UV-Absorptionsmessung nach der Gradientenzentrifugation bestimmt (vgl.2.3.1.).

B,D: Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 30 min mit FdUrd/BrdUrd und mit Kollagenase inkubiert und nach Dekantieren der abgelösten Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Die von der Platte abgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, ebenfalls zweimal mit HBSS gewaschen und auf die Platte zurückpipettiert. Anschließend wurden die Zellen 18 h mit FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) inkubiert und entsprechend A,C aufgearbeitet. (●-●: abgelöste Zellen ; ▲-▲: angewachsene Zellen)

Bei Verkürzung der Behandlungsdauer der Hepatozyten mit Kollagenase von 18 h auf 30 min erfolgte das Ablösen der Zellen und der Anstieg der DNA-Reparatur erst bei höheren Kollagenaseaktivitäten (Abb.4B,D). Das Ergebnis zeigt, daß auch eine kürzere, eher der Perfusionszeit entsprechende Behandlungsdauer der Hepatozyten mit Kollagenase zur Induktion von DNA-Reparatur ausreicht. Da die Kollagenaseexposition der Hepatozyten während der Leberperfusion nur unzureichend in der Zellkultur simuliert werden kann, ist der quantitative Anteil der Kollagenase-abhängigen DNA-Schäden an der Background-Reparatur allerdings nur schwer abschätzbar.

3.1.2.3. Möglichkeiten zur Reduzierung der Background-Reparatur

Der in unbehandelten primären Hepatozytenkulturen auftretende DNA-Reparatur-Background beeinträchtigt die Empfindlichkeit des Reparaturnachweises. Die radioaktive Strahlung des ^3H -dCyd und die Leberperfusion mit Kollagenase konnten zwar als Faktoren identifiziert werden, die wesentlich zur Background-Reparatur beitragen. ^3H -dCyd und Kollagenase sind aber für die Messung der DNA-Reparatur bzw. für die Hepatozytenisolierung unentbehrlich. Es wurde daher versucht, durch folgende Modifikationen der experimentellen Bedingungen die Background-Reparatur zu reduzieren:

- durch Abtrennung replizierter doppelsträngiger DNA aus S-Phase-Zellen
- durch Verlängerung der Vorinkubation der Hepatozyten.

3.1.2.3.1. Abtrennung replizierter doppelsträngiger DNA

Während der Inkubation der Hepatozyten mit ^3H -dCyd werden in die neusynthetisierten DNA-Stränge der S-Phase-Zellen erhebliche Mengen an Radioaktivität eingebaut. Daher ist die DNA dieser Zellen wahrscheinlich durch den ^3H -Zerfall stärker geschädigt als die DNA in nicht replizierenden Zellen. Da im alkalischen Cs-Salz-Gradienten nur die dichtemarkierten, neusynthetisierten DNA-Stränge der S-Phase-Zellen abgetrennt werden, könnte die Reparatur der ^3H -Schäden in den parentalen DNA-Strängen von S-Phase-Zellen einen überproportionalen Anteil an der Background-Reparatur haben. Die folgenden Experimente sollten zunächst klären, ob sich in parentalen Strängen replizierender Zellen eine höhere Background-Reparatur als in der Gesamtpopulation der Leberzellen nachweisen läßt.

Die gesamte DNA von S-Phase-Zellen läßt sich nach Dichtemarkierung mit BrdUrd als doppelsträngige Hybrid-DNA (leichter und dichter Einzelstrang) von der übrigen DNA durch Gleichgewichtszentrifugation im neutralen Cs-Salz-Gradienten trennen (vgl.2.4.). Um den Einfluß replizierter mt-DNA bei der Quantifizierung der replizierten n-DNA zu vermeiden, wurden die folgenden Versuche mit der DNA von isolierten Zellkernen durchgeführt. Das Gradientenprofil in Abb.5 zeigt eine Trennung der doppelsträngigen DNA isolierter Zellkerne in replizierte Hybrid-DNA mit BrdUrd-dichtemarkiertem Tochterstrang und in nicht replizierte leichte DNA. Der hohe Radioaktivitätspeak bei höherer Dichte beruht auf ^3H -dCyd-Einbau in replizierte und reparierte Hybrid-DNA, die Radioaktivität im Bereich der DNA mit normaler Dichte ist auf DNA-Reparatur in nicht replizierter DNA zurückzuführen.

Die Zentrifugationsbedingungen wurden so gewählt, daß bei der Halbierung des Gradienten für den Rebanding-

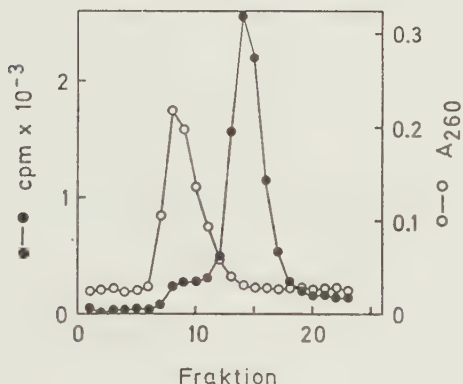


Abb.5 Trennung replizierter und nicht replizierter doppelsträngiger DNA: Gradientenprofil der n-DNA nach Zentrifugation im neutralen Cs-Salz-Gradienten

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h mit FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) inkubiert. Nach Isolierung der Zellkerne (vgl. 2.6.) erfolgte die Aufarbeitung entsprechend 2.4. Die Dichte im Gradienten steigt von links nach rechts.

Schritt die Hybrid-DNA möglichst vollständig in der dichten Hälfte verblieb. Zur Bestimmung der DNA-Reparatur in den parentalen Strängen der Hybrid-DNA und der leichten DNA wurden die beiden Gradientenhälften unter alkalischen Bedingungen erneut zentrifugiert (vgl. Schema in 2.4.). Aus Radioaktivität und DNA-Gehalt im leichten Peak der beiden alkalischen Gradienten (Abb.6) wurde die Gesamt-DNA-Reparatur (Background-Reparatur) in replizierter und nicht replizierter DNA ermittelt. Da das Gradientenprofil in Abb.6A im Vergleich zu Abb.6B nur eine sehr geringe Radioaktivität im dichten Bereich zeigt, kann im leichten Peak die DNA-Reparatur in nicht replizierter DNA bestimmt

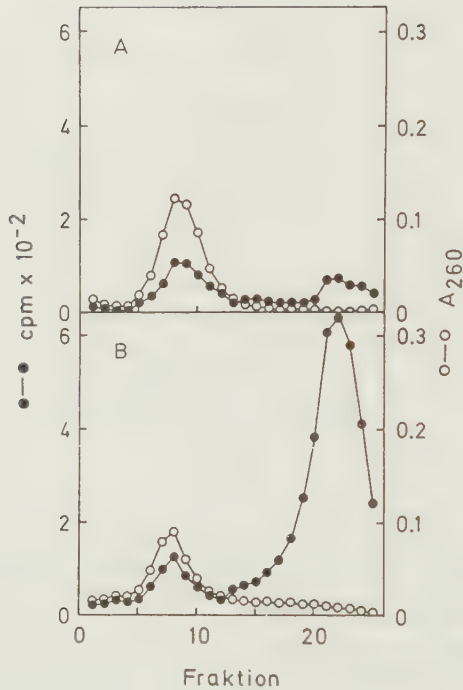


Abb. 6 Bestimmung der Background-Reparatur in replizierter und nicht replizierter DNA: Gradientenprofile der n-DNA nach Zentrifugation im alkalischen Cs-Salz-Gradienten

Inkubation der Zellen, Zellkernisolierung und die Trennung nicht replizierter und replizierter doppelsträngiger DNA im neutralen Gradienten erfolgte wie in Legende zu Abb. 5 angegeben. Die anschließende Zentrifugation der DNA unter alkalischen Bedingungen erfolgte entsprechend 2.3.1. A: nicht replizierte DNA, B: replizierte DNA

werden. Die Reparatur in replizierter DNA ergibt sich dann aus der Differenz von Gesamt-Reparatur und Reparatur in nicht replizierter DNA. Von 82 cpm Background-Reparatur pro μ g der gesamten DNA sind 17,9 cpm beziehungsweise

21,8% (Mittelwerte aus Tab.3) auf Reparatur der parentalen DNA von S-Phase-Hepatozyten zurückzuführen. Da in primären Hepatozytenkulturen etwa 0,1% der Zellen im Lauf der 18 h-Inkubation ihre DNA replizieren (44), ist im Vergleich zu Zellen, die während der Inkubation ihre DNA nicht repliziert haben, in S-Phase-Hepatozyten die Background-Reparatur um den Faktor 279 erhöht (Faktor = $(17,9:0,1):(64,1:99,9) = 279$).

Demnach könnte der Reparatur-Background bei Abtrennung replizierter DNA unter neutralen Bedingungen und anschließender erneuter Zentrifugation der doppelsträngigen leichten DNA im alkalischen Gradienten um ca. 20% reduziert werden. Da jedoch im neutralen Gradienten der Dichteunterschied zwischen leichter DNA und Hybrid-DNA sehr klein ist (Abb.5), würde die notwendige exakte Teilung des Gradienten vor dem Reband-Schritt die routinemäßige Aufarbeitung der Proben erschweren und die Reproduzierbarkeit der Er-

Tabelle 3 Background-Reparatur in replizierter und nicht replizierter DNA von unbehandelten Hepatozyten

	DNA-Reparatur (% der Gesamt-Reparatur)			
	cpm/ ug DNA	Exp.1	Exp.2	
Reparatur in nicht replizierter DNA	64,6	(81,8)	63,5	(74,8)
Reparatur in replizierter DNA	14,4	(18,2)	21,4	(25,2)
Gesamt-Reparatur	79,0	(100)	84,9	(100)

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h mit FdUrd/BrdUrd und $^3\text{H-dCyd}$ (10 $\mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) inkubiert. Aus isolierten Zellkernen (vgl. 2.6.) wurde die DNA isoliert und im neutralen Cs-Salz-Gradienten (vgl.2.4.) in replizierte doppelsträngige Hybrid-DNA und nicht replizierte doppelsträngige DNA getrennt. Anschließend wurde im alkalischen Gradienten die DNA-Reparatur in den nicht dichtemarkierten Einzelsträngen bestimmt. Berechnung der DNA-Reparatur in replizierter und nicht replizierter DNA siehe Text.

gebnisse leiden. Deshalb wurde bei den folgenden Experimenten die DNA weiterhin unter alkalischen Bedingungen zentrifugiert.

3.1.2.3.2. Verlängerung der Vorinkubation der Hepatozyten

DNA-Schäden, die im Zusammenhang mit der Hepatozyten-isolierung, also z.B. durch die Kollagenasebehandlung (vgl. 3.1.2.2.2.) entstehen, sollten nach einer bestimmten Inkubationszeit der Zellen weitgehend repariert sein. In einem Vorversuch zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Background-Reparatur zeigte sich nach 12 h eine Abflachung des ^3H -dCyd-Einbaus durch Reparatur (Abb.7). Mit den folgenden Experimenten wurde daher überprüft, ob durch eine Verlängerung der Vorinkubationszeit die Background-Reparatur herabgesetzt werden kann.

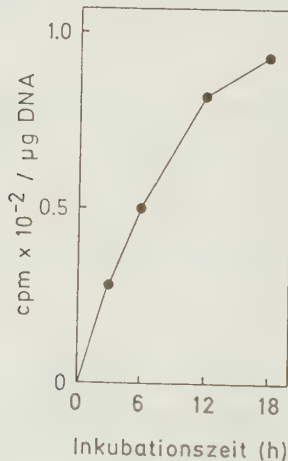


Abb.7 Zeitabhängigkeit der Background-Reparatur
Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen unterschiedlich lange mit FdUrd/BrdUrd und ^3H -dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.1.

Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit besteht eine erhöhte bakterielle Kontaminationsgefahr für die Hepatozytenkulturen. Die folgenden Versuche wurden daher mit steril präparierten Hepatozyten durchgeführt. Nach der 1,5 h Anwachszeit auf den Kulturplatten wurden die Hepatozyten nicht sofort mit FdUrd und BrdUrd vorinkubiert, sondern erst 12 h später. Die anschließende 18 h-Inkubationszeit der Hepatozyten mit FdUrd, BrdUrd und ^3H -dCyd erfolgte also ebenfalls um 12 h verschoben. Im gleichen Experiment wurden Kontrollen mitgeführt, die nach dem üblichen Inkubationsschema behandelt wurden. Wie Tabelle 4 zeigt, wird durch die zeitliche Verzögerung des Versuchsbeginns die Backgroundreparatur um etwa 35% reduziert. Da die Reparatur UV-bestrahlter Zellen durch die Vorinkubation nicht abnimmt, ist es unwahrscheinlich, daß die Erniedrigung der Background-Reparatur auf einer Änderung der spezifischen Aktivität des Nukleotid-Pools oder einer Abnahme der Reparaturkapazität der Hepatozyten beruht.

Zur Überprüfung, ob die Reparatureffekte gentoxischer Substanzen bei einem erniedrigten Background empfindlicher nachzuweisen sind, wurden gleichzeitig Hepatozytenkulturen mit 10 mM DMN oder 0,2 mM 2-AAF behandelt. Beide Substanzen wirken erst nach Aktivierung durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen gentoxisch. Da die Aktivität einiger Monooxygenasen in primären Hepatozytenkulturen nach 24 h bereits auf die Hälfte reduziert ist (11,45,46), sollte sich an diesen beiden Testsubstanzen zeigen, ob eine Verlängerung der Vorinkubationszeit sinnvoll sein könnte. Beide Testsubstanzen führten in Hepatozyten unter den geänderten Versuchsbedingungen (12 h Vorinkubation) zu weniger Reparatereinbau, vor allem wenn die 12 h-Vorinkubation ohne Serum durchgeführt wurde (Tab.4). Bezogen auf die jeweiligen Kontrollen sind die Effekte in Hepatozytenkulturen, die 12 h in Gegenwart von

Serum vorinkubiert wurden, jedoch höher als in Kulturen, die nicht vorinkubiert wurden (Tab.4). Zumindest im Falle von DMN und AAF ist dies eine Folge der erniedrigten Background-Reparatur. Bei UV-bestrahlten Zellen waren auch die absoluten Werte für die DNA-Reparatur nach der 12 h-Vorinkubation deutlich erhöht (Tab.4).

Tabelle 4 Abhängigkeit der DNA-Reparatur in Hepatozyten von der Dauer der Vorinkubation im Medium

	DNA-Reparatur					
	cpm/ μ g DNA (% der Kontrolle)					
	keine Vorinkubation		12 h Vorinkubation			
			ohne Serum		mit Serum	
Kontrolle	77,8	(100)	49,3	(100)	51,8	(100)
UV (10 J/m ²)	324,2	(417)	484,0	(982)	446,7	(862)
DMN (10 mM)	884,0	(1136)	595,1	(1207)	767,5	(1482)
AAF (0,2 mM)	222,3	(286)	89,3	(181)	189,4	(366)

1,5 h nach dem Ausplattieren wurden die Zellen gewaschen und wie oben angegeben entweder sofort mit BrdUrd/FdUrd behandelt oder 12 h später. Die 12 h Vorinkubation wurde mit oder ohne 10% Serum im Medium durchgeführt. 1 h nach Zugabe von FdUrd und BrdUrd wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden, wenn angegeben, mit UV-Licht bestrahlt ($1 \text{ J} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$) und 18 h mit FdUrd/BrdUrd, ³H-dCyd (10 μ Ci/ml; 18 Ci/mMol) und den Testsubstanzen weiterinkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.1.

Durch die Verlängerung der Vorinkubation kann demnach die Background-Reparatur in Hepatozyten wesentlich erniedrigt werden. Die erhöhte Empfindlichkeit der Reparaturnachweises wird aber durch eine Erniedrigung der Reparaturreffekte Metabolismus-abhängiger Substanzen beeinträchtigt. Gegen die verlängerte Inkubation der Hepatozyten spricht auch, daß dafür eine sehr aufwendige Isolierung der Hepatozyten unter sterilen Bedingungen erforderlich ist, daß sich der zeitliche Aufwand für die Versuche wesentlich erhöht und der Start der Inkubation nachts durchgeführt werden muß.

3.2. Bestimmung der DNA-Reparatur in Hepatozyten mit der autoradiographischen Methode

Bei der autoradiographischen UDS-Methode wird der Einbau ^3H -markierter Desoxyribonukleoside in einzelne Zellen bestimmt. Durch Überschichten der Zellen mit einer Filmemulsion läßt sich der radioaktive Zerfall von ^3H durch die Bildung von Silberkörnern in der Filmemulsion sichtbar machen und den zellulären Strukturen zuordnen. Die Entstehung der Silberkörner über den Kernen von Zellen, die sich nicht in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) befinden, wird als Hinweis auf den Einbau radioaktiv markierter Desoxyribonukleoside in DNA durch Exzisionsreparatur (unscheduled DNA synthesis, UDS) interpretiert. Die Zahl der Silberkörner dient als Meßgröße zur quantitativen Bestimmung der DNA-Reparatur. S-Phase-Zellen sind wegen des hohen ^3H -Einbaus an den von Silberkörnern geschwärzten Zellkernen gut zu erkennen.

Ursprünglich wurde diese Technik zur DNA-Reparaturmessung in Fibroblasten entwickelt (47). Die UDS-Methode mit primären Hepatozytenkulturen, die erstmals von Williams (10) beschrieben wurde, wird zur Zeit häufig zur Bestimmung der DNA-Reparatur in Leberzellen angewandt.

3.2.1. Überprüfung der Methodik

Die Verteilung von Silberkörnern über einzelnen Zellen von Hepatozytenkulturen, die nach der in 2.3.2. beschriebenen Methode inkubiert worden waren, ist in Abb.8 gezeigt. In Abb.8A ist eine für unbehandelte Hepatozyten typische Silberkornverteilung über dem schwach gefärbten Zellkern und dem Cytoplasma zu erkennen. Auf eine Cytoplasmafärbung wurde verzichtet, da die Ausdehnung der Zelle aus der

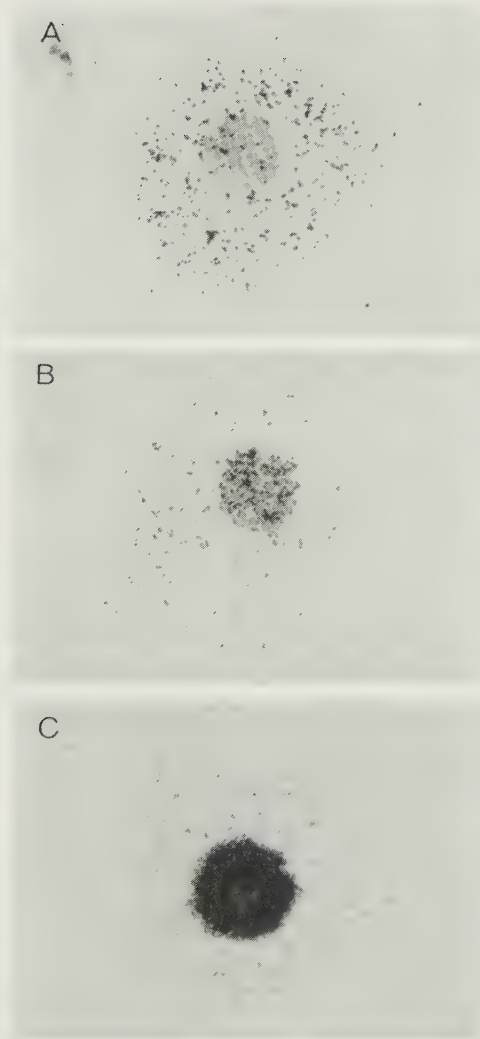


Abb.8 Verteilung von Silberkörnern über einzelnen Hepatozyten

Die Zellen wurden 18 h mit ^3H -dCyd ($10 \mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) in An- oder Abwesenheit von 10 mM DMN inkubiert. Die Herstellung der autoradiographischen Präparate erfolgte entsprechend 2.3.2.

A: unbehandelte Zelle, B: behandelte Zelle (10 mM DMN),
C: S-Phase-Zelle

lichten Silberkornverteilung um den Zellkern klar hervorgeht. Die Silberkornzahl über dem Kern einer Zelle, die aus einer mit 10 mM DMN behandelten Kultur stammt (Abb.8B), ist im Vergleich zu der unbehandelten Zelle (Abb.8A) deutlich erhöht. Bei der Zelle mit stark geschwärztem Zellkern (Abb.8C) handelt es sich um eine S-Phasen-Zelle. Die gezeigten Bilder entsprechen den aus der Literatur bekannten Bildern von autoradiographischen Präparaten mit Hepatozyten (48,49).

3.2.2. Silberkorn-Background über den Hepatozyten

Auffällig an den Autoradiographien ist die relativ hohe Silberkornzahl über dem Cytoplasma und dem Zellkern von Hepatozyten, die nicht mit gentoxischen Substanzen behandelt worden waren (Abb.8A). Diese Background-Markierung der Zellen mit Silberkörnern, die an Fibroblasten nicht zu beobachten ist, kann auch durch extensive Waschung der Hepatozytenkulturen mit unmarkierten Nukleosiden nicht entfernt werden (50). Sie wird auf unspezifische radioaktive Markierung z.B. von Proteinen (15,44) oder neuerdings auf den Einbau von Radioaktivität in die DNA von Mitochondrien (51) zurückgeführt. Leberzellen enthalten sehr viele Mitochondrien (1000-2000/Zelle), die - wie in anderen Zellen auch - ihre DNA unabhängig vom Zellzyklus replizieren. Außerdem läßt sich die cytoplasmatische Background-Markierung in Hepatozyten durch Ethidiumbromid, einen bei niedrigen Konzentrationen spezifischen Inhibitor der mt-DNA-Synthese (52,53), reduzieren (51). Zumindest für den Silberkornbackground im Cytoplasma erscheint daher mt-DNA-Synthese als Ursache plausibel.

Die Entstehung von Silberkörnern über dem Zellkern unbehandelter Hepatozyten wird ebenso auf den Einbau von Ra-

dioaktivität in die DNA von Mitochondrien, die in der Cytoplasmaschicht über dem Kern liegen (51) oder mit unspezifisch gebundener Radioaktivität (15) erklärt. Bei der Auswertung autoradiographischer Präparate im UDS-Test wird daher meist die Silberkornzahl über dem Zellkern um die Silberkornzahl kerngroßer Cytoplasmabereiche korrigiert und als Netto-Silberkörner/Kern ausgedrückt (10). Nach einem anderen Auswerteverfahren soll die Zahl der Silberkörner über Kern und Cytoplasmabereichen getrennt dargestellt werden, um eine Beeinflussung der DNA-Reparaturmessung durch Effekte von Testsubstanzen auf die mt-DNA-Synthese zu vermeiden (51).

Die Identifizierung der Background-Reparatur in Hepatozyten mit Hilfe des Gradientenzentrifugationsverfahrens (vgl.3.1.2.) führte zu der Hypothese, daß die Silberkörner zumindest über dem Zellkern von Kontrollzellen nicht auf unspezifischem Background oder mt-DNA-Synthese beruhen, sondern auf DNA-Reparatur. Mit den folgenden Experimenten wurde versucht, die Herkunft dieser Kernmarkierung zu klären.

Zunächst wurde untersucht, ob die Markierung der Kerne auch nach deren Isolierung aus den Zellen erhalten bleibt. Dazu wurden Hepatozyten 18 h mit ^3H -dCyd inkubiert. Anschließend wurden von einem Teil der Zellen die Kerne isoliert und auf Objektträger ausgestrichen. Eine vergleichende Analyse der Silberkornzahl über isolierten Kernen und über Kernen intakter Zellen ergab keinen Unterschied (Tab.5). Das deutet darauf hin, daß die Radioaktivität in die Kerne inkorporiert vorliegt und nicht in darüberliegende Mitochondrien.

Um zu überprüfen, ob Mitochondrien in angewachsenen, flach ausgebreiteten Hepatozyten überhaupt, wie postuliert wurde, den Kern überlagern, wurde die Verteilung der Mitochondrien in den Zellen bestimmt. Dazu wurden He-

Tabelle 5 Markierung der Zellkerne unbehandelter Hepatozyten mit Silberkörnern

	Schwärzungsfläche (rel. Einheiten $\pm$ SEM)
Kerne in ganzen Zellen	6,35 $\pm$ 2,38
isolierte Kerne	5,91 $\pm$ 1,17

Hepatozyten wurden 18 h mit ^3H -dCyd (10 $\mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne isoliert (vgl. 2.6.), in Eisessig-Ethanol (1:3) fixiert und auf Objektträger ausgestrichen. Die Weiterverarbeitung erfolgte zusammen mit den parallel angesetzten Präparaten angewachsener Hepatozyten entsprechend 2.3.2. Zur Auswertung wurde die durch Silberkörnervorgerufene Schwärzungsfläche über jeweils 30 Zellkernen/Präparat bestimmt und aus drei Präparaten der Mittelwert $\pm$ SEM gebildet

patozyten entsprechend 2.7. mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123, der sich selektiv an die Membranen der Mitochondrien lebender Zellen anlagert (30), inkubiert. Im überwiegenden Teil der Zellen war über den Zellkernen keine Fluoreszenz zu erkennen (Abb.9). Nur in wenig ausgebreiteten Zellen oder nahe zusammenliegenden Zellgruppen konnten einzelne Mitochondrien beobachtet werden. Die Mitochondriendichte im Cytoplasma ist demnach um ein Vielfaches höher als über dem Zellkern. Deshalb kann die Silberkornmarkierung über den Kernen nicht mit einer ^3H -Markierung mt-DNA erklärt werden. Wegen der hohen Mitochondriendichte in unmittelbarer Umgebung der Zellkerne ist allerdings eine Beeinflussung der Silberkornmarkierung im Randbereich der Zellkerne nicht auszuschließen. Die beiden Untersuchungen bestätigen die Hypothese, daß der Silberkörnervorgerufene Background über den Zellkernen unbehandelter Hepatozyten zum überwiegenden Teil auf DNA-Reparatur zurückgeführt werden muß und sich damit in seiner biologischen Herkunft vom cytoplasmatischen Background unterscheidet.

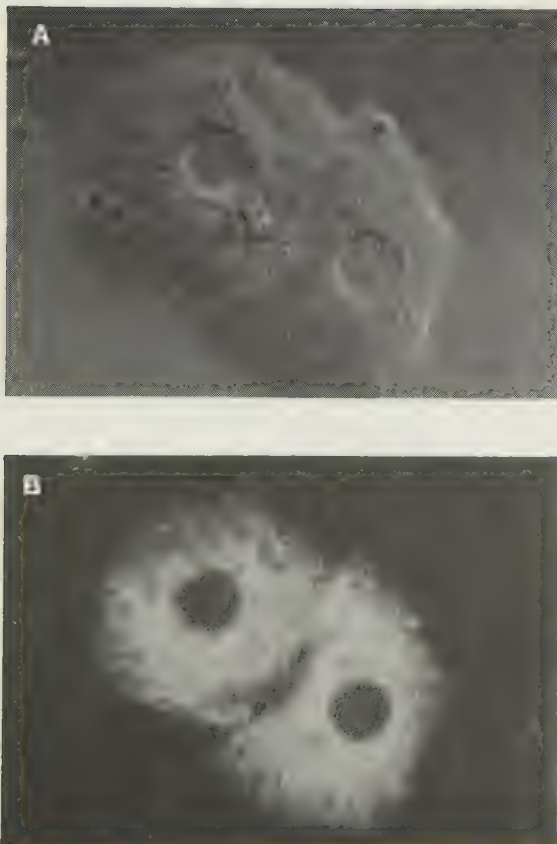


Abb.9 Verteilung der Mitochondrien in Hepatozyten
A: Phasenkontrast, B: Fluoreszenzaufnahme der gleichen
Zellen nach Färbung der Mitochondrien mit Rhodamin 123
(vgl.2.7.)

3.3. Vergleich der autoradiographischen Methode und der Gradientenzentrifugationsmethode anhand ausgewählter Modellsubstanzen

Anhand der folgenden Versuche sollte die Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit der beiden vorgestellten Testsysteme zum Nachweis der DNA-Reparatur in Hepatozyten verglichen werden. Primäre Hepatozytenkulturen wurden dazu mit ausgewählten Testsubstanzen behandelt und parallel mit der autoradiographischen UDS-Methode und der Gradientenzentrifugationsmethode auf das Auftreten von DNA-Reparatur untersucht.

Abgesehen von den grundsätzlich verschiedenen Methoden der DNA-Reparaturbestimmung beschränkte sich der Unterschied bei der Inkubation der Hepatozyten auf folgende nicht zu vermeidende Punkte:

- Inkubation der Zellen in Zellkulturflaschen oder Petrischalen (Gradient) gegenüber der Inkubation auf Deckplättchen in Kulturplatten mit mehreren Fächern. (Autoradiographie)
- Anwesenheit von FdUrd/BrdUrd während der 1 h-Vorinkubation und während der Hauptinkubation (Gradient).

Die Verwendung von $^3\text{H-dCyd}$ anstelle des üblicherweise in der UDS-Technik verwendeten $^3\text{H-dThd}$ als Desoxyribonukleosid zur DNA-Markierung ist für die Gradientenzentrifugationsmethode notwendig, um eine Erniedrigung des spezifischen Einbaus von $^3\text{H-dThd}$ durch die hohe BrdUrd-Konzentration zu vermeiden. Da Unterschiede in der Poolgröße von Desoxycytidin- und Thymidinnukleotiden in Zellen bekannt sind (54), die einen Vergleich der Ergebnisse erschweren würden und außerdem ein Hinweis vorliegt (55), daß die Sensitivität der UDS-Technik durch den Austausch von $^3\text{H-dTyd}$ gegen $^3\text{H-dCyd}$ erhöht wird, wurde auch in der autoradiographischen Methode $^3\text{H-dCyd}$ zur DNA-Markierung eingesetzt.

Die Möglichkeit des Einbaus radioaktiv markierter Metabolite des ^3H -dCyd in RNA konnte durch Zentrifugation von DNA und RNA in einem neutralen Cs-Salz-Gradienten ausgeschlossen werden. Die neutralen Bedingungen sind erforderlich, um eine Hydrolyse der RNA zu vermeiden. Anhand der UV-Absorption im dichten Teil des Gradienten läßt sich die RNA nachweisen (Abb.10). Die parallel durchgeführte Radioaktivitätsmessung der Fraktionen zeigt im Bereich des RNA-Peaks aber keinen Anstieg der ^3H -Markierung, der auf eine radioaktive Markierung der RNA hinweisen würde.

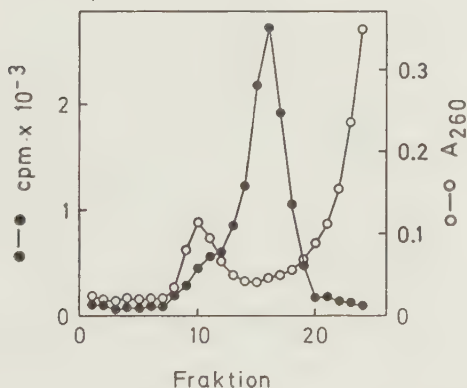


Abb.10 Bestimmung der radioaktiven Markierung von RNA:
Gradientenprofil der DNA und RNA nach
Zentrifugation im neutralen Cs-Salz- Gradienten

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen
18 h mit FdUrd/BrdUrd und ^3H -dCyd (10 $\mu\text{Ci/ml}$;
18 Ci/mMol) inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte entspre-
chend 2.4. Die Dichte im Gradienten steigt von links nach
rechts.

3.3.1. Der Nachweis stark wirksamer Substanzen:
Dimethylnitrosamin als Positivkontrolle

Zunächst wurde überprüft, ob die Gentoxizität einer stark wirksamen Substanz, wie Dimethylnitrosamin (DMN), mit beiden Methoden nachzuweisen ist. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß DMN im untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 2,5 und 20 mM sowohl bei Anwendung der Gradiententechnik (Abb.11) als auch, unabhängig vom Aus-

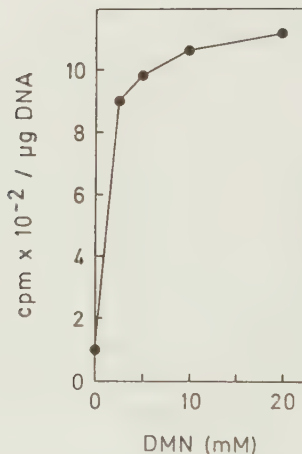


Abb.11 DNA-Reparatur nach Behandlung mit DMN:
Gradientenzentrifugationsmethode

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) mit DMN inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.1. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

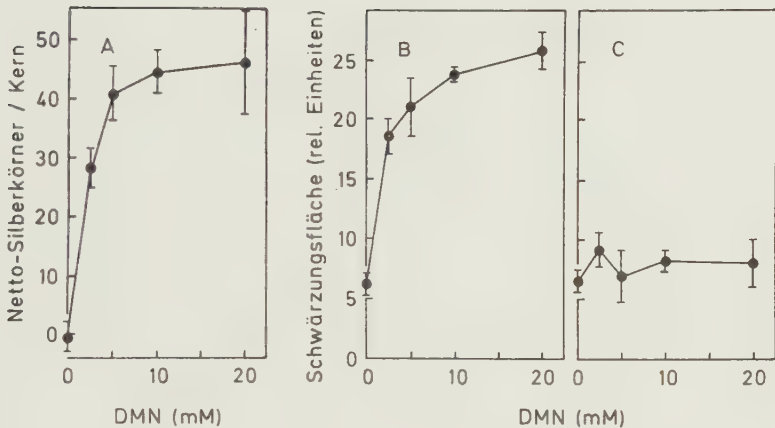


Abb.12 DNA-Reparatur nach Behandlung mit DMN:
Autoradiographische Methode

Die Zellen wurden 18 h in Gegenwart von ^3H -dCyd (10 $\mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) mit DMN inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.2. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente. (Mittelwerte $\pm$ SEM)

A: Differenzbildung der Silberkornzahl über Zellkern und Cytoplasma, B: Schwärzungsfläche über den Zellkernen, C: Schwärzungsfläche über dem Cytoplasma

werteverfahren, mit der UDS-Methode (Abb.12) zu eindeutig positiven und konzentrationsabhängigen Effekten führt. Außerdem zeigen die Konzentrations-Wirkungskurven einen sehr ähnlichen Verlauf.

3.3.2. Der Nachweis schwach wirksamer Substanzen

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Untersuchung einer stark gentoxischen Substanz bei Anwendung beider Methoden zu vergleichbaren Ergebnissen führt, wurden im folgenden schwächer wirksame Verbindungen untersucht, von denen angenommen werden muß, daß der Nachweis ihrer Gentoxizität höhere Anforderungen an die angewandten Techniken stellen würde.

3.3.2.1. Aliphatische Hydroxamsäuren

Als Testsubstanzen wurden Hydroxyharnstoff (HU), Acetohydroxamsäure (AHA) und N-Hydroxyurethan (HUT) ausgewählt. HU führt nach metabolischer Aktivierung durch Lebermikrosomen zu DNA-Schäden in Säugetierzelllinien (56). Aus Vorversuchen war bekannt, daß HU auch in Hepatozyten zu einer schwachen Induktion von DNA-Reparatur führt. Da AHA und HUT Strukturanaloga von HU sind, wurde vermutet, daß sie ähnlich wirken wie HU.

Abb.13 zeigt, daß alle drei Substanzen DNA-Reparatur in Hepatozyten induzieren. Die Wirkung der Substanzen ist zwar wesentlich schwächer als die von DMN, aber sowohl mit der Gradientenzentrifugationsmethode (Abb.13) als auch mit der UDS-Technik (Abb.14) eindeutig identifizier-

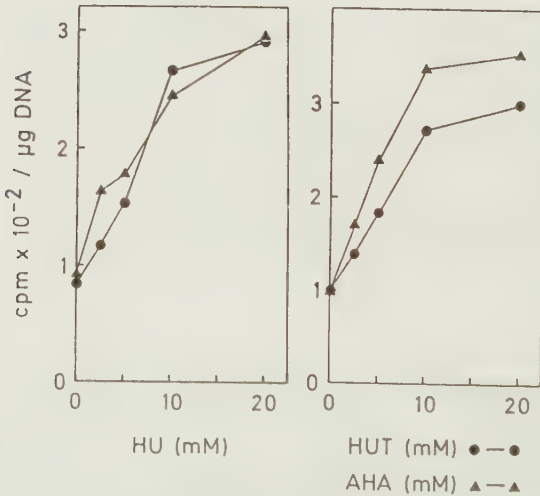


Abb.13 DNA-Reparatur nach Behandlung mit aliphatischen Hydroxamsäuren: Gradientenzentrifugationsmethode
Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Abb.11.
Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente mit HU und jeweils eines Experiments mit AHA und HUT.

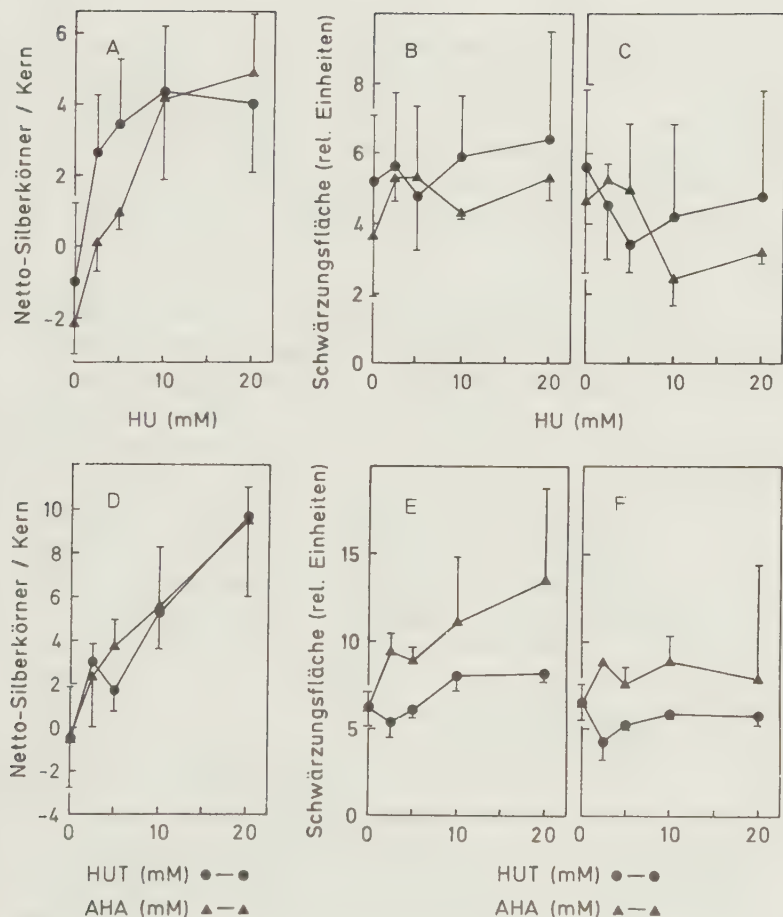


Abb.14 DNA-Reparatur nach Behandlung mit aliphatischen Hydroxamsäuren: Autoradiographische Methode

Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Abb.12. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente mit HU und jeweils eines Experiments mit AHA und HUT. A,D: Differenzbildung der Silberkornzahl über Zellkern und Cytoplasma, B,E: Schwärzungsfläche über den Zellkernen, C,F: Schwärzungsfläche über dem Cytoplasma

bar. Bei Anwendung der UDS-Technik sind die Effekte allerdings nur bei Differenzbildung von Kern- und Cytoplasmamarkierung signifikant (Abb.14A,D). Wird die Kernmarkierung getrennt von der Cytoplasmamarkierung für jede Konzentration als Absolutwert aufgetragen (Abb.14B,E), lassen die hohen Schwankungen der Mittelwerte aus den drei Versuchsansätzen keine eindeutige Aussage zu. Durch Subtraktion der Silberkornzahl kerngroßer Cytoplasmabereiche von der Silberkornzahl über den Zellkernen werden offensichtlich individuelle Unterschiede der Zellen und methodisch bedingte Schwankungen zwischen den autoradiographischen Präparaten teilweise ausgeglichen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß eine Erhöhung der Zahl ausgewerteter Zellen die Standardabweichung wesentlich verringern würde und der tendenziell erkennbare Anstieg der Kernmarkierung signifikant würde. Der Arbeitsaufwand für die Auswertung der autoradiographischen Präparate würde sich dadurch aber beträchtlich erhöhen.

3.3.2.2. Thioharnstoff

Thioharnstoff (TU) ist ein Kanzerogen in Ratten, das nach chronischer Applikation Schilddrüsentumore hervorruft (57). Die Kanzerogenität von TU wird auf einen epigenetischen (nicht gentoxischen) Mechanismus zurückgeführt: TU hemmt die Schilddrüsenperoxidase und damit die Synthese der Schilddrüsenhormone. Das daraus resultierende hormonelle Ungleichgewicht führt zu einer kontinuierlichen hormonellen Stimulierung der Schilddrüse, als deren Folge eine Hyperplasie und schließlich die neoplastische Transformation der Schilddrüse auftritt (57-58). Das gelegentliche Auftreten von Tumoren in anderen Organen (59-61), beispielsweise in der Leber (62) kann mit diesem Wir-

kungsmechanismus von TU allerdings nur schwer erklärt werden.

Eindeutige Hinweise auf eine Gentoxizität von TU liegen bisher nicht vor. Lonati-Galligani et al. (51) testeten TU mit der autoradiographischen UDS-Methode und fanden eine deutliche, konzentrationsabhängige Erhöhung der Kernmarkierung, gleichzeitig aber auch eine parallele Erhöhung der Silberkornzahl über dem Cytoplasma. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die gesteigerte Kernmarkierung nicht auf das Auftreten von DNA-Reparatur zurückgeführt, sondern auf TU-stimulierte mt-DNA-Synthese in der Cytoplasmaschicht über dem Zellkern. Nach den bereits beschriebenen Ergebnissen (vgl. 3.2.2.) wird die Markierung der Zellkerne nur unwesentlich durch mt-DNA-Synthese beeinflusst. Die Erhöhung der Silberkornzahl über den Zellkernen sollte daher auf DNA-Reparatur beruhen.

Zunächst wurde mit der Gradientenzentrifugationsmethode TU auf DNA-Reparatur induzierende Wirkung untersucht, da bei dieser Methode die Reparaturmessung unabhängig von der mitochondrialen DNA-Synthese ist. Wie in Abb. 15 gezeigt, führt TU im getesteten Konzentrationsbereich (5-25 mM) zu einer relativ geringen, aber konzentrationsabhängigen und reproduzierbaren Erhöhung der DNA-Reparatur um maximal 40% gegenüber der Kontrolle.

Die Möglichkeit, daß TU lediglich durch eine Erhöhung der spezifischen Radioaktivität des Desoxycytidinnukleotid-Pools die Background-Reparatur erhöht, wurde durch Kontrollexperimente ausgeschlossen. Wurden Hepatozyten in An- oder Abwesenheit von 20 mM TU mit UV-Licht bestrahlt, ergaben die gemessenen DNA-Reparaturwerte (Tab. 6) keinen Hinweis auf eine TU-induzierte Pooländerung, da die Kombination von TU und UV-Licht lediglich zu einem rein additiven Reparaturreffekt führt.

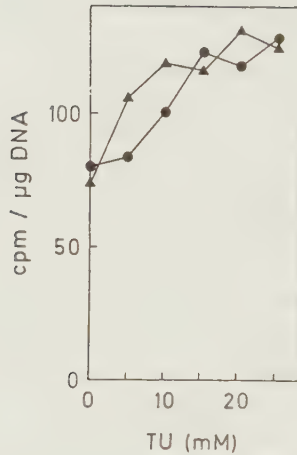


Abb.15 DNA-Reparatur nach Behandlung mit TU:
Gradientenzentrifugationsmethode

Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Abb.11. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

Tabelle 6 Wirkung von Thioharnstoff auf die UV-Licht-induzierte DNA-Reparatur in Hepatozyten

Behandlung	DNA-Reparatur cpm/µg DNA
Kontrolle	87,3
UV (10 J/m ²)	354,0
TU (20 mM)	116,2
UV (10 J/m ²) + TU (20 mM)	393,0§

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen wie angegeben behandelt und 18 h mit FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml, 18 Ci/mMol) inkubiert. Nach Zentrifugation der isolierten DNA im alkalischen Cs-Salz-Gradienten erfolgte die Bestimmung der DNA-Reparatur entsprechend 2.3.1. (Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen)

§ zu erwartender Wert bei

-additivem Effekt: 383 cpm/ug DNA;

-"Pool"-Effekt : 471 cpm/ug DNA.

Die mit der autoradiographischen Methode erhaltenen Daten entsprechen den Ergebnissen von Lonati-Galligani et al.(51). Die Markierung mit Silberkörnern steigt über Kern und Cytoplasma der Hepatozyten nach Behandlung mit TU konzentrationsabhängig an (s.Abb.16B,C). Der Anstieg der Kernmarkierung verläuft ähnlich wie die mit der Gradientenzentrifugationsmethode gewonnene Reparaturkurve (vgl.Abb.15 und Abb 16B). Die auf der Differenzbildung von Kern- und Cytoplasmamarkierung basierenden Daten (Abb.16A) geben in diesem Fall keinen Hinweis auf eine Erhöhung der Kernmarkierung, bzw. auf einen Reparaturanstieg.

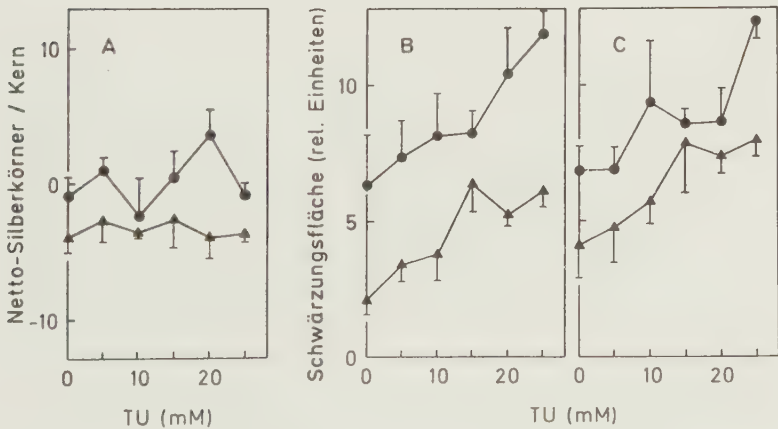


Abb.16 DNA-Reparatur nach Behandlung mit TU:
Autoradiographische Methode

Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Abb.12.
Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

A: Differenzbildung der Silberkornzahl über Zellkern und Cytoplasma, B: Schwärzungsfläche über den Zellkernen, C: Schwärzungsfläche über dem Cytoplasma

Das Ergebnis zeigt, daß die Gentoxizität einer Substanz, die zu geringer Induktion von DNA-Reparatur führt und gleichzeitig die DNA-Synthese in Mitochondrien stimuliert, mit der autoradiographischen Methode bei Zugrundelegung der beiden zur Zeit üblichen Auswerteverfahren nicht erkannt wird. Mit der Gradientenzentrifugationsmethode dagegen ist die Gentoxizität von TU eindeutig identifizierbar.

3.4. Wirkung von Hydroxyharnstoff auf die DNA-Synthese in Hepatozyten

Hydroxyharnstoff (HU) ist ein Inhibitor der Ribonukleosiddiphosphat-Reduktase (63). Die durch HU hervorgerufene Reduzierung des Desoxyribonukleotid-Pools der Zellen hat offenbar keinen Einfluß auf die DNA-Reparatur (64), hemmt aber die replikative DNA-Synthese. Im Vergleich zu anderen Zellen in Kultur, deren replikative DNA-Synthese nach HU-Behandlung um 85-95% abnimmt (65,66), scheint die DNA-Replikation in primären Hepatozyten weniger HU-sensitiv zu sein (67). Im getesteten Konzentrationsbereich (5-20 mM) ist die replikative DNA-Synthese nur auf maximal 40-50% des Kontrollwerts reduzierbar (Abb.17). Die Beobachtung, daß in autoradiographischen Präparaten von HU-behandelten Hepatozyten die Silberkornzahl im Cytoplasma nicht signifikant verändert ist (vgl. Abb.14C), während gleichzeitig ab einer HU-Konzentration von 5 mM S-Phase-Kerne nicht mehr nachweisbar sind, führte zu folgender Arbeitshypothese: HU hemmt die DNA-Synthese im Zellkern, nicht aber in den Mitochondrien. Die unterschiedliche Hemmung der replikativen DNA-Synthese in verschiedenen Zelltypen könnte dementsprechend mit einer unterschiedlichen Proliferationsrate und Mitochondrienzahl der Zellen erklärt werden.

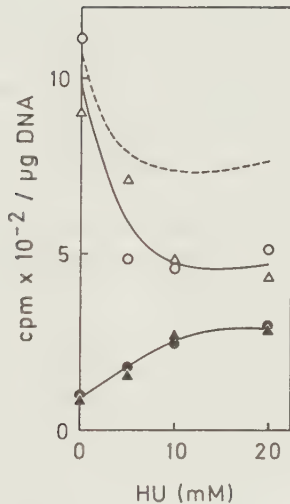


Abb.17 Replikative DNA-Synthese und DNA-Reparatur in Hepatozyten nach Behandlung mit HU

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ^3H -dCyd (10 $\mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) mit HU inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur (ausgefüllte Symbole) und der replikativen DNA-Synthese (offene Symbole) erfolgte entsprechend 2.3.1. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente. Die DNA-Reparaturwerte entsprechen den Werten in Abb.13.

----: Summenkurve aus replikativer DNA-Synthese und DNA-Reparatur

Eine detaillierte Untersuchung der Wirkung von HU auf die replikative DNA-Synthese erschien im Rahmen dieser Arbeit auch deshalb von Interesse, weil HU in einigen DNA-Reparatur-Testsystemen mit Hepatozyten Anwendung findet. HU wird dabei eingesetzt, um die getrennte Analyse der durch replikative DNA-Synthese und DNA-Reparatur hervorgerufenen radioaktiven DNA-Markierung zu umgehen (15,29,44,68,69). Die in diesen Testsystemen zu beobachtende hohe,

HU-insensitive DNA-Restsynthese ist nicht näher untersucht. Sie schränkt die Empfindlichkeit und die Aussagekraft dieser Tests stark ein und macht einen Vergleich mit Testergebnissen, die durch Gradientenzentrifugation oder Autoradiographie erhalten werden, schwierig.

Um die HU-Effekte auf die mt-DNA-Synthese von der Wirkung auf die n-DNA-Synthese unterscheiden zu können, wurden mt-DNA und n-DNA in einem EBr-CsCl-Gradienten getrennt (vgl.2.5.). In Abb.18 sind typische Profile der

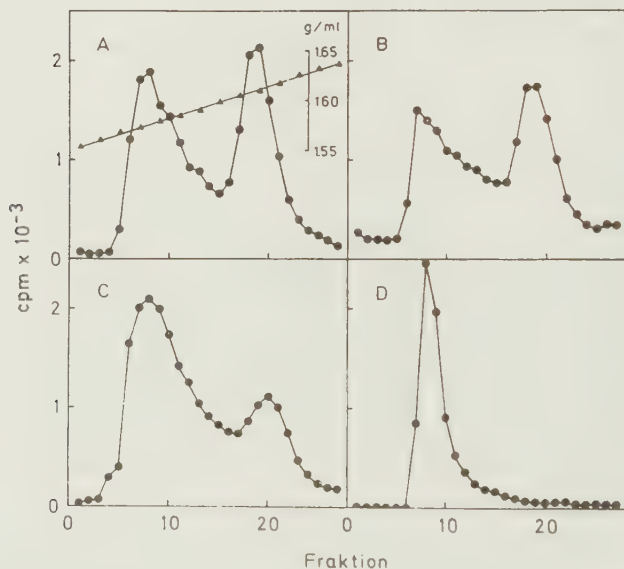


Abb.18 Trennung von n-DNA und mt-DNA im EBr-CsCl-Gradienten

Die Zellen wurden 18 h in Gegenwart von ³H-dCyd (10 μ Ci/ml; 18 Ci/mMol) und den angegebenen Substanzen inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend 2.5. (Zellkernisolierung vgl 2.6.). Die Dichte im Gradienten steigt von links nach rechts.

A: DNA unbehandelter Hepatozyten, B: DNA HU-behandelter Hepatozyten (20 mM), C: DNA EBr-behandelter Hepatozyten(2 μ M), D: DNA isolierter Zellkerne

DNA von Hepatozyten nach Zentrifugation im EBr-CsCl-Gradienten zusammengestellt. Zur Identifizierung der beiden Radioaktivitätspeaks wurde auch die DNA von Hepatozyten, die mit EBr inkubiert worden waren (Abb.18C) und die DNA aus isolierten Kernen zentrifugiert (Abb.18D). EBr hemmt in niedrigen Konzentrationen die mt-DNA-Synthese (52,53). Da durch die EBr-Behandlung der Radioaktivitätspeak im dichten Bereich des Gradienten reduziert wird (Abb.18C), muß dieser Dichtebereich der mt-DNA entsprechen. Der scharfe Peak der DNA isolierter Zellkerne (Abb.18D) kennzeichnet die Position der weniger dichten n-DNA.

Aus der ähnlichen Höhe der beiden Radioaktivitätspeaks in unbehandelten Hepatozyten geht hervor (Abb.18A), daß während der 18 h-Inkubation etwa gleich viel ^3H -dCyd in n-DNA (Reparatur und replikative Synthese) und mt-DNA eingebaut wird. Eine HU-Behandlung (20 mM) der Hepatozyten während der Inkubation ändert nichts am Verhältnis der radioaktiven Markierung von n-DNA zu mt-DNA (Abb. 18B). Die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität in den beiden Peaks war mit dieser Methode allerdings nicht möglich, da EBr die photometrische Bestimmung der DNA-Menge (A_{260}) stört. Um auszuschließen, daß HU die radioaktive Markierung von n-DNA und mt-DNA in gleicher Höhe reduziert, wurde daher die spezifische Radioaktivität der gesamten DNA mit Hilfe eines neutralen Cs-Salz-Gradienten bestimmt (vgl.2.4.). Aus Abb.19 läßt sich nur ein geringer Einfluß von HU auf die Gesamt-DNA-Synthese in Hepatozyten ableiten. Das bedeutet, daß in HU-behandelten und unbehandelten Hepatozyten nicht nur das Verhältnis der ^3H -Markierung von mt-DNA zu n-DNA weitgehend konstant bleibt, sondern auch die spezifische Radioaktivität der DNA. Der Anteil der mt-DNA-Synthese an der Gesamtsynthese ist zur Verdeutlichung in Abb.19 eingezeichnet. Die radioaktive Markierung der n-DNA ergibt sich aus der Dif-

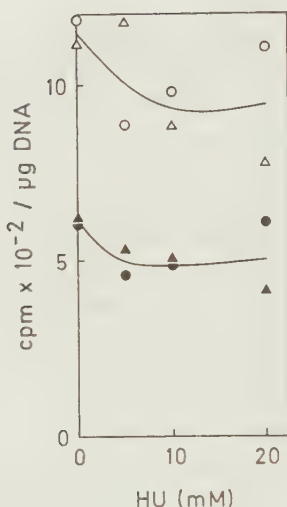


Abb.19 Spezifische Radioaktivität der DNA nach Behandlung mit HU

Die Zellen wurden 18 h in Gegenwart von ^3H -dCyd (10 $\mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) und den angegebenen Substanzen inkubiert. Die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der gesamten DNA (offene Symbole) und der mt-DNA (ausgefüllte Symbole) erfolgte entsprechend 2.5. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

ferenz zwischen Gesamt-Synthese und mt-Synthese.

In diesen Experimenten war aufgrund der fehlenden BrdUrd-Markierung keine Unterscheidung zwischen replikativer n-DNA-Synthese und DNA-Reparatur möglich. Um den HU-Effekt auf DNA-Reparatur und replikative n-DNA-Synthese differenzieren zu können, wurden aus Hepatozyten, die in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ^3H -dCyd und mit HU (5-20 mM) inkubiert worden waren, die Zellkerne isoliert (vgl. 2.6.). Mit Hilfe des alkalischen Cs-Salz-Gradientenverfahrens konnte anschließend nachgewiesen werden, daß HU die replikative DNA-Synthese in den Zellker-

nen ab einer Konzentration von 10 mM vollständig hemmt (Abb.20). Gleichzeitig wirkt HU, wie gezeigt (vgl. 3.3.2.1.), mit steigender Konzentration gentoxisch. Der ^3H -Einbau durch Stimulierung der Reparatur gleicht dabei den geringeren ^3H -dCyd-Einbau durch replikative n-DNA-Synthese aus. Die Gesamtmarkierung der n-DNA bleibt daher konstant. Zur Verdeutlichung dieses Effekts sind in Abb.21 die Gradientenprofile der n-DNA von unbehandelten und HU-behandelten (20 mM) Hepatozyten gegenübergestellt.

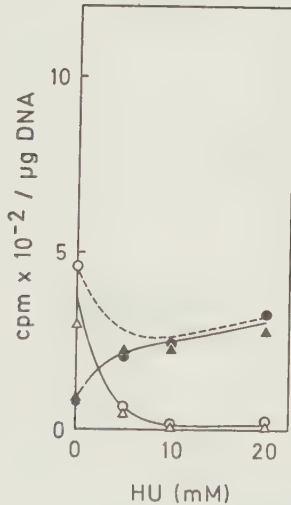


Abb.20 Replikative DNA-Synthese und DNA-Reparatur in isolierten Zellkernen nach Behandlung mit HU

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ^3H -dCyd ($10 \mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) mit DMN inkubiert. Nach Isolierung der Zellkerne (vgl.2.6.) wurden die DNA-Reparatur (ausgefüllte Symbole) und die replikative DNA-Synthese (offene Symbole) entsprechend 2.3.1. bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente.

----: Summenkurve aus replikativer DNA-Synthese und DNA-Reparatur

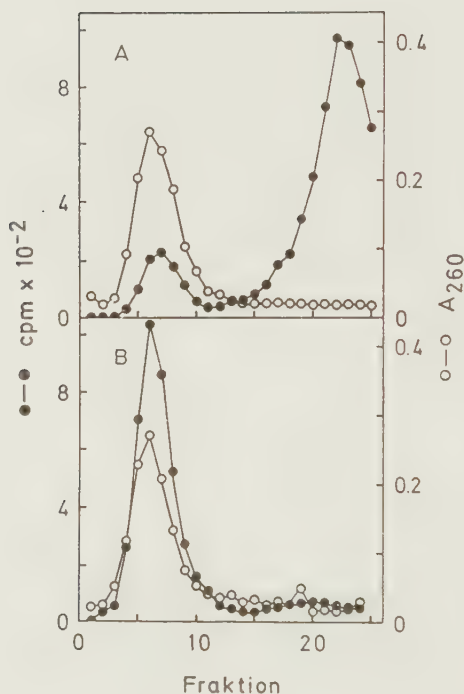


Abb.21 Gradientenprofile der DNA isolierter Zellkerne von unbehandelten und HU-behandelten Hepatozyten nach der ersten Zentrifugation

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd, ^3H -dCyd ($10 \mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) in An- bzw. Abwesenheit von HU inkubiert. Die Isolierung der Zellkerne erfolgte entsprechend 2.6., die Aufarbeitung entsprechend 2.3.1. Die Dichte im Gradienten steigt von links nach rechts. A: unbehandelte Zellen, B: behandelte Zellen (20 mM HU)

Die Wirkung von HU auf die verschiedenen Arten der DNA-Synthese in Hepatozyten ist in Tab.7 zusammengefaßt. Die zellspezifische Reduzierung der replikativen DNA-Synthese durch HU hängt demzufolge von der ursprünglichen Proliferationsrate der unbehandelten Zellen ab, die DNA-Restsynthese nach HU-Behandlung vom Ausmaß der mt-DNA Synthese.

Tabelle 7 Wirkung von Hydroxyharnstoff auf die DNA-Synthese in Hepatozyten

	HU-Effekt
replikative DNA-Synthese im Zellkern	
replikative DNA-Synthese in Mitochondrien	---
DNA-Reparatur	

3.5. Untersuchung der differenzierten Rattenhepatom-Zelllinie 2sFou auf ihre Einsetzbarkeit im DNA-Reparaturtest

Hepatozyten in Primärkultur waren aufgrund ihrer hohen metabolischen Kapazität bisher die einzigen zur Verfügung stehenden Zellen, die ohne Verwendung externer Metabolisierungssysteme in Testsystemen eingesetzt werden können. Erst in den letzten Jahren wurden verschiedene, aus entdifferenzierten Reuber H35 Rattenhepatom-Zellen (24,25) etablierte differenzierte Zelllinien bekannt, die in unterschiedlichem Ausmaß leberspezifische Monooxygenasen exprimieren (21,70). Im folgenden wurde nun untersucht, ob sich die als Dauerkulturen züchtbaren Hepatomzellen anstelle von isolierten Hepatozyten im Reparaturtest einsetzen lassen.

Aus den differenzierten Zelllinien wurde die Linie 2sFou ausgewählt, die nach Behandlung mit Enzyminduktoren sowohl Cytochrom P-448- als auch P-450-abhängige Monooxygenasen in relativ hohen spezifischen Aktivitäten exprimiert (22,71). Die DNA-Reparaturmessung erfolgte mit der Gradientenzentrifugationstechnik, die sich in den vorangegangenen Untersuchungen als zuverlässiger als die autoradiographische Methode erwiesen hatte. Außerdem hätte der hohe Anteil an S-Phase-Zellen in den rasch proliferierenden Hepatomzellkulturen die Anwendung der autoradiographischen Methode sehr erschwert.

3.5.1. Überprüfung der Methodik

Vorversuche zur Anwendung des Gradientenzentrifugationsverfahrens ergaben, daß die für die Hepatozytenkulturen erarbeiteten Versuchsbedingungen problemlos auf die 2sFou-

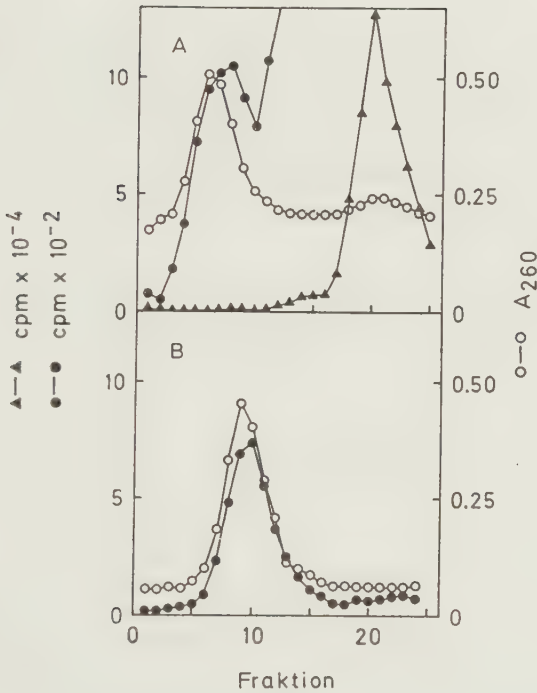


Abb.22 Gradientenprofile der DNA von DMN-behandelten 2sFou-Hepatomzellen

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ^3H -dCyd ($10 \mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) mit 10 mM DMN inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend 2.3.1. Die Dichte im Gradienten steigt von links nach rechts.
A: Profil nach der ersten Zentrifugation, B: Profil nach dem zweiten Reband

Zellen übertragen werden können (vgl.2.3.1.). Da die Hepatomzellen aber schneller proliferieren, ist der ^3H -dCyd-Einbau durch replikative DNA-Synthese erheblich höher als in Hepatocyten. Bei den im folgenden beschriebenen Experimenten wurden während der 18 h-Inkubation von den 2sFou-Zellen $48580 \pm 11320 \text{ cpm}/\mu\text{g DNA}$ ($n=6, \pm \text{SD}$)

und von Hepatocyten 1420 ± 290 cpm/ μ g DNA ($n=7$, $\pm$ SD) eingebaut. Um eine Überlagerung des Radioaktivitätspeaks der reparierten DNA durch den Radioaktivitätspeak der replikativ synthetisierten DNA zu vermeiden, wurde daher ein zusätzlicher zweiter Reband-Schritt zur Reinigung der reparierten DNA durchgeführt. Abb.22 zeigt ein typisches Gradientenprofil der DNA von DMN-behandelten 2sFou-Zellen nach zweimaliger Rezentrifugation unter alkalischen Bedingungen. Der radioaktive Peak der replikativen DNA-Synthese ist weitestgehend entfernt.

3.5.2. Vergleich von 2sFou-Zellen und Hepatozyten

3.5.2.1. Bestimmung der Monooxygenaseaktivität

Zur Erhöhung der Aktivitäten der Cytochrom P-448- und P-450-abhängigen Monooxygenasen wurden die 2sFou-Zellen mit Dexamethason und Benz(a)anthrazen vorbehandelt (vgl.2.2.2.). Um eine ausreichende Enzyminduktion für die Metabolisierung der Testsubstanzen während der Inkubation sicherzustellen, wurden die Enzymaktivitäten ca. 2 h vor Beginn der Testinkubation überprüft. Zur genaueren Analyse der Enzymaktivitäten während der Testinkubation wurden sie zusätzlich zum Zeitpunkt des Inkubationsbeginns mit der Testsubstanz und nach der 18 h-Inkubation bestimmt (Tab.8). Als Marker für die Anwesenheit und Aktivität der P448- und P450-abhängigen Monooxygenasen wurde die Hydroxylierung von Benz(a)pyren bzw. die Epoxidierung von Aldrin verwendet (vgl.2.8.). Die Abnahme der Monooxygenaseaktivitäten nach 18 h auf ca. 50% der zu Versuchsbeginn gemessenen Aktivität, läßt sich damit erklären, daß die Testinkubation ohne Enzyminduktoren durchgeführt wurde.

Die Aktivitäten liegen deutlich unter den in frisch isolierten Hepatozyten bekannten Enzymaktivitäten (BPH: $17 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ (45), AE: $340 \text{ pMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ (46)). Nach 24 h in Kultur sind ähnlich wie in 2sFou-Zellen die Monooxygenaseaktivitäten in Hepatozyten auf 50% reduziert (45,46).

Tabelle 8 Aktivität der Benzpyrenhydroxylase (BPH) und Aldrinepoxydase (AE) in 2sFou-Zellen

		Enzymaktivität	
		$(\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1})$	
		BPH	AE
Inkubationsbeginn (0 h)	Exp.1	311,4	23,0
	Exp.2	223,0	36,7
Inkubationsende (19 h)	Exp.1	128,7	12,2
	Exp.2	114,0	12,9

Die Zellen wurden 32 h vor Versuchsbeginn mit $5 \text{ } \mu\text{M}$ Dexamethason und 18 h vor Versuchsbeginn mit $20 \text{ } \mu\text{M}$ Benz(a)anthrazen im Medium vorbehandelt. Die Enzymaktivitäten wurden direkt vor der Inkubation der Zellen mit BrdUrd/FdUrd und nach der Inkubation (19 h) entsprechend 2.8. gemessen. Während des Versuchs waren Dexamethason und Benz(a)anthrazen nicht im Medium enthalten.

3.5.2.2. Bestimmung der Reparaturkapazität

Zahlreiche Nagetierzelllinien weisen im Vergleich zu frisch isolierten Zellen eine vergleichsweise geringe Kapazität für die DNA-Reparatursynthese auf (72,73). Um die Fähigkeit der Rattenhepatomzellen zur DNA-Reparatursynthese mit der der Hepatozyten vergleichen zu können, wurde der Einbau von $^3\text{H-dCyd}$ nach UV-Bestrahlung bestimmt. UV-Licht wurde verwendet, da es unabhängig von

Metabolismus und Membrantransport direkt die DNA schädigt. Im Vergleich zu Hepatozyten inkorporieren 2sFou-Zellen bis ca. 40 J/m^2 etwa zweimal mehr $^3\text{H-dCyd}$ durch Reparatur (Abb.23). Bei UV-Dosen über 40 J/m^2 steigt die Reparatur in 2sFou-Zellen weiter an, während sie in Hepatozyten offenbar bereits gesättigt ist. Die Reparaturwerte nicht mit UV bestrahlter 2sFou-Zellen liegen deutlich unter den Background-Reparaturwerten in

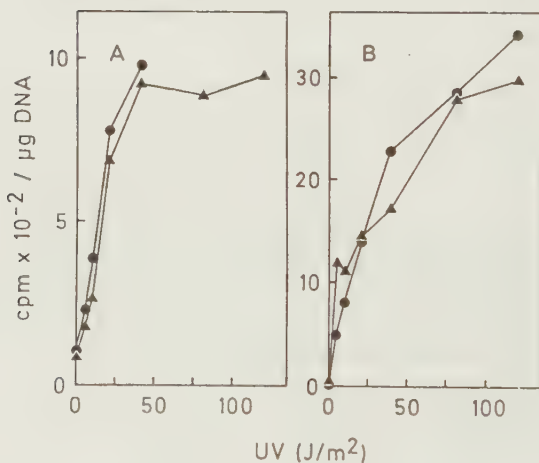


Abb.23 DNA-Reparatur in Hepatozyten und 2sFou-Zellen in Abhängigkeit von der UV-Dosis

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt (254 nm , $1 \text{ J} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) und 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und $^3\text{H-dCyd}$ ($10 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur erfolgte entsprechend 2.3.1.

A: Hepatozyten, B: 2sFou-Zellen

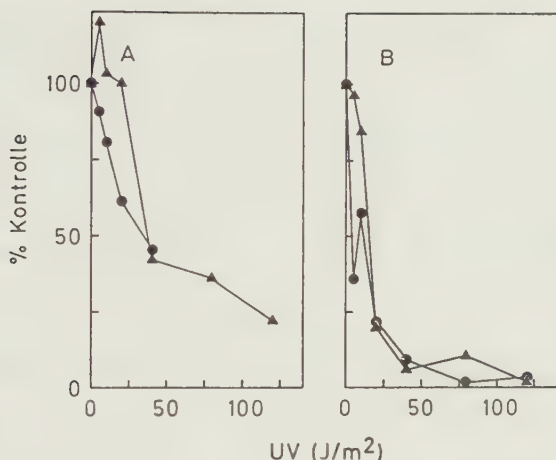


Abb.24 Replikative DNA-Synthese in Hepatozyten und 2sFou-Zellen in Abhängigkeit von der UV-Dosis
Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt (254 nm , $1 \text{ J} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) und 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ^3H -dCyd ($10 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$; 18 Ci/mMol) inkubiert. Die Bestimmung der replikativen DNA-Synthese erfolgte entsprechend 2.3.1.
A: Hepatozyten, B: 2sFou-Zellen

Hepatozyten. Bei den im folgenden beschriebenen Experimenten wurden in 2sFou-Zellen $31 \pm 7 \text{ cpm}/\mu\text{g DNA}$ ($n=6$, $\pm \text{SD}$) und in Hepatozyten $89 \pm 5 \text{ cpm}/\mu\text{g DNA}$ ($n=6$, $\pm \text{SD}$) durch Background-Reparatur eingebaut. Die replikative DNA-Synthese wird in 2sFou-Zellen und Hepatozyten bereits durch niedrige UV-Dosen stark gehemmt (Abb.24). Ab einer UV-Intensität von ca. 40 J/m^2 beträgt die replikative DNA-Synthese in Hepatozyten etwa 20-40% der Kontrolle. Die UV-resistente DNA-"Restsynthese" liegt damit in Hepatozyten deutlich höher als in 2sFou-Zellen.

Eine direkte Quantifizierung der Reparaturkapazität von 2sFou-Zellen und Hepatozyten ist nicht möglich, da als

Ursache für die unterschiedliche ^3H -Markierung der DNA durch UV-Reparatur auch Unterschiede in der Größe des endogenen Desoxynukleotid-Pools der Zellen in Frage kommen. Nach den vorliegenden Ergebnissen verfügen 2sFou-Zellen jedoch über eine hohe Kapazität zur Reparatursynthese. Der Nachweis UV-Licht-induzierter DNA-Reparatur ist in diesen Zellen sogar mit größerer Empfindlichkeit als in Hepatozyten möglich.

3.5.2.3 Induktion von DNA-Reparatur durch ausgewählte Modellsubstanzen

Im folgenden wurde untersucht, ob die metabolische Aktivität der 2sFou-Zellen ausreicht, die Gentoxizität ausgewählter Modellsubstanzen ähnlich empfindlich wie mit Hepatozytenkulturen nachzuweisen. Als Testsubstanzen wurden folgende Verbindungen eingesetzt:

- HU, da diese Substanz in Abwesenheit exogener Aktivierungssysteme bisher nur in Hepatozyten gentoxisch gewirkt hat (vgl.3.3.2.1.)(56) und deshalb offenbar durch leberspezifische Enzyme aktiviert wird
- DMN und DEN, weil diese Nitrosamine aufgrund ihrer Aktivierung durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen bisher ebenfalls nur in Hepatozyten gentoxisch waren und demnach wie HU "kritische" Testsubstanzen für Mutagenitätstestsysteme darstellen
- BP, dessen Gentoxizität in Hepatozyten als Folge einer effizienten enzymatischen Inaktivierung schwer nachweisbar ist (51).

Die Induktion von DNA-Reparatur durch die angeführten Substanzen wurde parallel zu den 2sFou-Zellen auch in Hepatozyten untersucht. Die Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz und die Bestimmung der DNA-Reparatur mit dem Gradientenzentrifugationsverfahren erfolgte dabei unter

identischen Bedingungen. Methodische Unterschiede zwischen 2sFou-Zellen und Hepatozyten ergaben sich nur durch die Vorbehandlung der 2sFou-Zellen mit Enzyminduktoren, durch den zusätzlichen zweiten Rebandschritt der DNA von 2sFou-Zellen und durch die Zellisolierung der Hepatozyten vor Versuchsbeginn.

Die Reparatur-induzierende Wirkung von HU und BP läßt sich in 2sFou-Zellen und in Hepatozyten eindeutig und mit ähnlicher Empfindlichkeit nachweisen (Abb.25A,B;26A,B). Auch die Effekte von HU und BP auf die replikative DNA-Synthese sind vergleichbar (Abb.25C,D;26C,D). Die unterschiedlich hohe DNA-Restsynthese nach HU-Behandlung (Abb.25C,D) ist eine Folge der Resistenz der mt-DNA-Synthese gegenüber einer Hemmung durch HU (vgl.3.4.). Aufgrund der im Vergleich zur n-DNA-Synthese niedrigen mt-DNA-Synthese wird die replikative DNA-Synthese in 2sFou-Zellen durch HU stärker gehemmt.

Die beiden getesteten Nitrosamine DMN und DEN führen sowohl in 2sFou-Zellen als auch in Hepatozyten zu einer klaren konzentrationsabhängigen Induktion von DNA-Reparatur und können mit beiden Zellsystemen als eindeutig genotoxisch identifiziert werden (Abb.27A,B;28A,B). Die maximalen Reparaturreffekte sind aber in 2sFou-Zellen niedriger als in Hepatozyten und werden speziell im Fall von DEN erst bei höheren Nitrosaminkonzentrationen erreicht. Die replikative DNA-Synthese der Hepatozyten wird durch DMN und DEN stärker gehemmt als in 2sFou-Zellen (Abb.27C,D;28C,D). In Hepatozyten nimmt der DNA-Reparaturreffekt bei höheren DEN-Konzentrationen im Gegensatz zu DMN ab (Abb.27A;28A). Da die Hemmung der replikativen DNA-Synthese auf eine ähnliche Cytotoxizität von DEN und DMN hinweist (Abb.27C;28C), ist der unterschiedliche Effekt auf die DNA-Reparatur schwer zu erklären. Die dargestellten Experimente zeigen, daß sich die Genotoxizität der ausgewählten Substanzen in 2sFou-Zellen ebenso wie mit Hepatocyten nachweisen läßt.

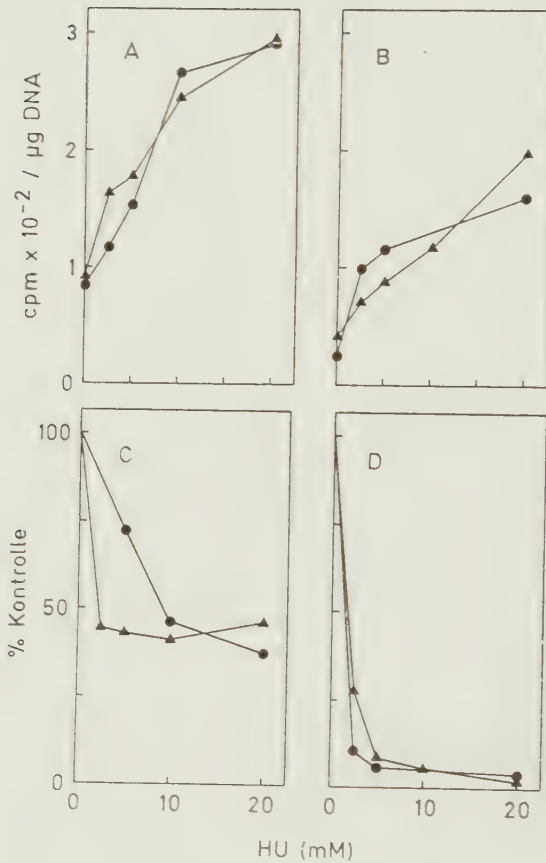


Abb.25 DNA-Reparatur und replikative DNA-Synthese in Hepatozyten und 2sFou-Hepatoma-Zellen nach Behandlung mit HU

Nach Vorinkubation mit FdUrd/BrdUrd wurden die Zellen 18 h in Gegenwart von FdUrd/BrdUrd und ³H-dCyd (10 µCi/ml; 18 Ci/mMol) mit der angegebenen Substanz inkubiert. Die Bestimmung der DNA-Reparatur und der replikativen DNA-Synthese erfolgte entsprechend 2.3.1.
A,B: DNA-Reparatur in Hepatozyten (A) und 2sFou-Zellen (B)
C,D: replikative DNA-Synthese in Hepatozyten (C) und 2sFou-Zellen (D)

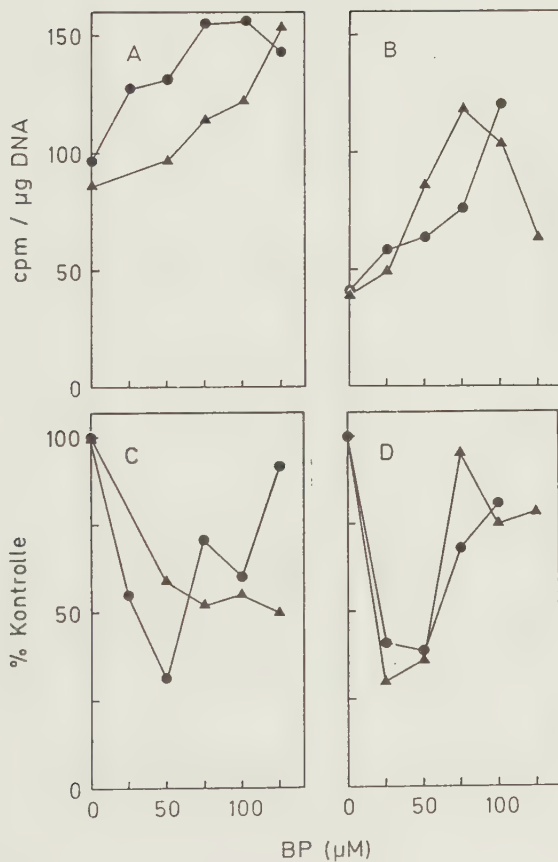


Abb.26 DNA-Reparatur und replikative DNA-Synthese in Hepatozyten und 2sFou-Hepatomazellen nach Behandlung mit BP

Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Abb.25

A,B: DNA-Reparatur in Hepatozyten (A) und 2sFou-Zellen (B)
C,D: replikative DNA-Synthese in Hepatozyten (C) und 2sFou-Zellen (D)

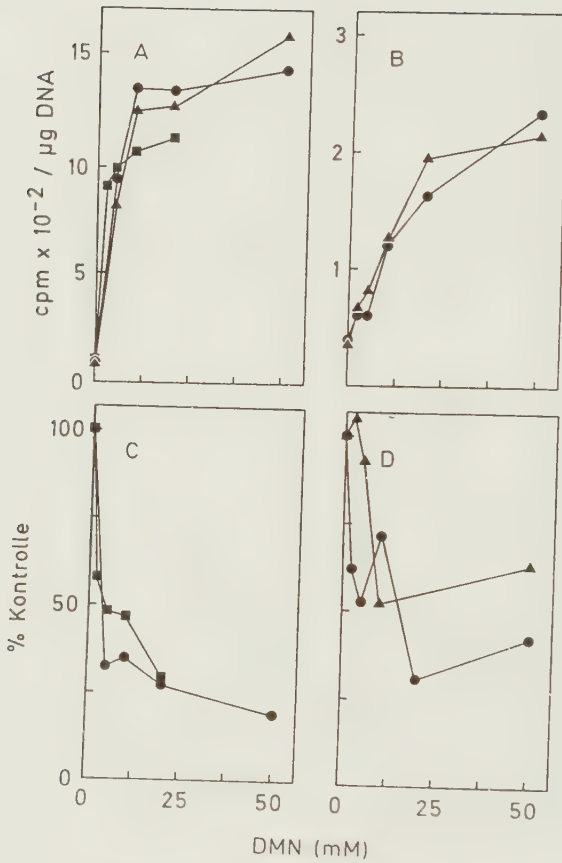


Abb.27 DNA-Reparatur und replikative DNA-Synthese in Hepatozyten und 2sFou-Hepatomzellen nach Behandlung mit DMN
Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Abb.25
A,B: DNA-Reparatur in Hepatozyten (A) und 2sFou-Zellen (B)
C,D: replikative DNA-Synthese in Hepatozyten (C) und 2sFou-Zellen (D)

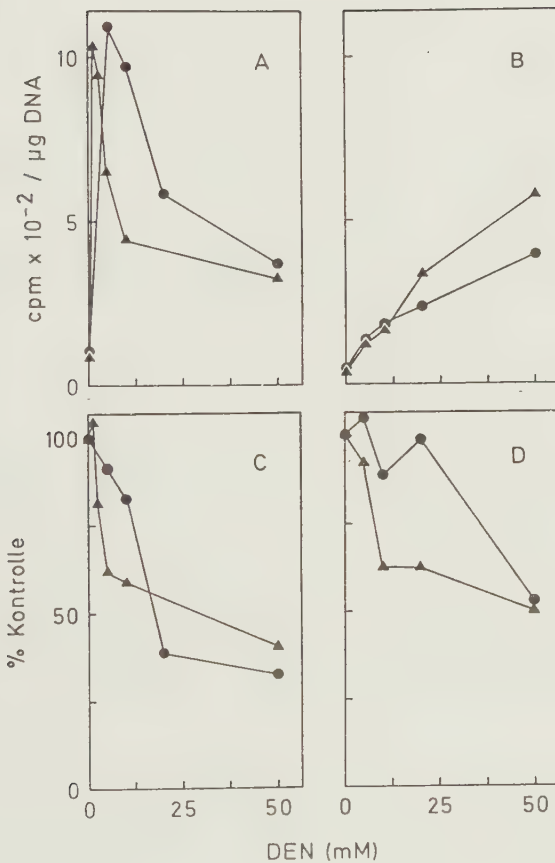


Abb.28 DNA-Reparatur und replikative DNA-Synthese in Hepatozyten und 2sFou-Hepatoma-Zellen nach Behandlung mit DEN

Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Abb.25

A,B: DNA-Reparatur in Hepatozyten (A) und 2sFou-Zellen (B)

C,D: replikative DNA-Synthese in Hepatozyten (C) und 2sFou-Zellen (D)

4. DISKUSSION

Primäre Hepatozyten sind die einzigen gegenwärtig in der in vitro-Mutagenitätstestung eingesetzten Zellen, die über das gesamte Spektrum der zur Metabolisierung von Fremdstoffen notwendigen Enzyme verfügen. Bei der Verwendung von Hepatozyten ist man daher nicht auf die Aktivierung der Testsubstanzen durch Leberfraktionen angewiesen, die nur unzureichend den Metabolismus intakter Zellen imitieren (6-9). Da Hepatozyten aber praktisch nicht proliferieren, lassen sie sich nicht zur Analyse von permanenten genetischen Veränderungen, also Gen- oder Chromosomenmutationen einsetzen. Die potentielle Mutagenität kann jedoch indirekt durch den Nachweis einer DNA-schädigenden Wirkung identifiziert werden, die sich z.B. durch Messung einer gesteigerten DNA-Reparatur erfassen läßt. Der DNA-Reparaturtest in Hepatozyten ist somit eines der wenigen in vitro-Testsysteme, in denen die metabolische Aktivierung der Testsubstanz in der gleichen Zelle erfolgt, in der auch der genetische Effekt der Chemikalie bestimmt wird. Aus diesem Grund kommt dieser Test in der in vitro-Mutagenitätstestung auch immer häufiger zur Anwendung und gewinnt damit praktische Bedeutung.

Problematik der DNA-Reparaturbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Reparatur wird in der Regel der Einbau radioaktiv markierter Desoxyribonukleoside während der Reparatursynthese gemessen. Da die markierten Nukleoside auch durch replikative Synthese in die DNA eingebaut werden, stellt die eindeutige Zuordnung der radioaktiven DNA-Markierung zu Reparatur oder replikativer Synthese das grundlegende Problem der Reparatursynthesemessung dar. Die meisten der bei Hepatozyten angewendeten Reparaturtestverfahren haben dieses Problem methodisch nur un-

zureichend gelöst. Es erschien daher notwendig, die Methodik der einzelnen Testsysteme genauer zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Verfahren untersucht, die eine spezifische Messung der DNA-Reparatur am ehesten erwarten ließen. Methoden, die auf eine qualitative Unterscheidung der beiden DNA-Synthesen verzichten und beispielsweise bereits die Erhöhung der radioaktiven DNA-Markierung als Anhaltspunkt für eine Reparatur-induzierende Wirkung einer Substanz betrachten (74,75), erschienen zu unspezifisch und zu wenig empfindlich. Sie wurden daher in die systematischen Untersuchungen nicht miteinbezogen. Im Laufe der vorliegenden Untersuchungen haben sich zusätzliche Anhaltspunkte ergeben, die die Vorbehalte gegenüber diesen Verfahren verstärken. Es zeigte sich unter anderem, daß auch in Hepatozyten die replikative DNA-Synthese einen großen Einfluß auf den Reparaturnachweis haben kann, obwohl primäre Hepatozyten in Kultur nur wenig proliferieren. Der Einbau radioaktiv markierter Nukleotide durch replikative DNA-Synthese kann beträchtlich höher sein als maximal meßbare Reparatur-effekte. Häufig führen gentoxische Substanzen im gleichen Konzentrationsbereich, in dem sie DNA-Reparatur auslösen, zu einer Hemmung der replikativen DNA-Synthese. Ohne eine qualitative Differenzierung der DNA-Reparatur von replikativer DNA-Synthese sind deshalb nur stark gentoxische Substanzen mit schwacher Wirkung auf die replikative DNA-Synthese als Reparatur-induzierend nachzuweisen.

Bisher zu wenig beachtet wurde auch die Tatsache, daß in Hepatozyten über 50% der replikativen DNA-Synthese in mt-DNA erfolgt. Die mt-DNA-Synthese unterliegt nicht derselben Regulation wie die n-DNA-Synthese und kann deshalb in allen Phasen des Zellzyklus ablaufen (76). Zwischen den Eigenschaften von mt- und n-DNA und den Mechanismen

ihrer Replikation bestehen eine Reihe wichtiger Unterschiede, die beispielsweise die DNA-Struktur, die Art der an der Replikation beteiligten Enzyme (77) und die Abhängigkeit von Nukleotidpools (78-81) betreffen. Deshalb können sich mt- und n-DNA-Synthese in der Empfindlichkeit gegenüber Substanzen unterscheiden (vgl.3.4.). Möglicherweise führen bestimmte DNA-Modifikationen auch zu einer unterschiedlichen Hemmung der mt- und n-DNA-Synthese. Die ähnlich verlaufende Abnahme der replikativen DNA-Synthese nach UV-Bestrahlung und HU-Behandlung in Hepatozyten und auch in 2sFou-Hepatomzellen deutet beispielsweise darauf hin, daß die mt-DNA-Synthese im Gegensatz zur n-DNA-Synthese durch UV-induzierte DNA-Schäden nicht gehemmt wird. Die mt-DNA-Synthese muß jedenfalls neben der n-DNA-Synthese als Prozeß betrachtet werden, der weitgehend unabhängig von der Synthese der n-DNA abläuft und bei ungenügender Spezifität der Meßmethoden die Messung der DNA-Reparatur zusätzlich beeinflussen kann.

Im Gegensatz zur replikativen mt-DNA-Synthese ist mt-DNA-Reparatur für die Reparaturbestimmung wahrscheinlich ohne Bedeutung, da nur ca. 1% der Hepatozyten-DNA in Mitochondrien vorliegt. Vorausgesetzt, mt-DNA würde mit einer der Reparatur von n-DNA entsprechenden Geschwindigkeit repariert, wäre der Anteil der mt-DNA-Reparatur verglichen mit der n-DNA-Reparatur entsprechend niedrig. Die Analyse der DNA-Reparatur in ganzen Zellen und isolierten Zellkernen mit dem Gradientenzentrifugationsverfahren zeigt auch keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Reparatur, der auf einen wesentlichen Einfluß mt-DNA-Reparatur hinweisen würde. mt-DNA-Reparatur konnte im übrigen bisher nur in Zellen nachgewiesen werden, die nicht vom Säugetier stammen (81,82).

Der Nachweis, daß Hydroxyharnstoff in Hepatozyten nur die replikative n-DNA-Synthese hemmt, nicht aber die

mt-DNA-Synthese, stellt auch die Anwendung von Hydroxyharnstoff zur Unterdrückung der replikativen DNA-Synthese in Reparaturtestsysteimen in Frage (15,29,44,68,69). Da Hydroxyharnstoff - wie gezeigt - in Hepatozyten Reparatur auslöst, wird der radioaktive Background bei der DNA-Reparaturmessung nur unwesentlich reduziert. Außerdem ist die Reparatur-induzierende Wirkung von Hydroxyharnstoff und von Substanzen, die gleichzeitig die mt-DNA-Synthese hemmen mit diesem Testsystem nicht zu erkennen (44). Die selektive Unempfindlichkeit der mt-DNA-Synthese gegenüber Hydroxyharnstoff beruht möglicherweise darauf, daß die mt-DNA-Synthese nicht auf hohe verfügbare intrazelluläre Desoxyribonukleotid-Konzentrationen angewiesen ist (78). In einer Variante des Testverfahrens mit Hydroxyharnstoff werden vor der Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der DNA die Zellkerne der Hepatozyten isoliert (29,83). Bei genügend hoher Reinheit der Kernpräparation von Mitochondrien würde mit diesem Verfahren ausschließlich DNA-Reparatur gemessen werden, da die replikative n-DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff vollständig gehemmt wird. Nach eigenen Erfahrungen bei der Anwendung dieses Verfahrens ist es allerdings schwierig, Kernpräparationen mit reproduzierbarer Reinheit zu gewinnen.

Die beiden anderen Testverfahren, die autoradiographische Methode und die Gradientenzentrifugationsmethode, die vom experimentellen Vorgehen eine höhere Empfindlichkeit als die bisher beschriebenen Methoden erwarten lassen, wurden in der vorliegenden Arbeit systematisch auf ihre Einsetzbarkeit für den Nachweis gentoxischer Chemikalien überprüft.

Neben dem direkten Vergleich der Meßempfindlichkeit anhand ausgewählter Modellsubstanzen wurden die in beiden Systemen auftretenden, bisher nicht untersuchten, "Backgroundphänomene" einer genaueren Analyse unterzogen. Dies

erschien vor allem deshalb von Bedeutung, da bei der Routinetestung von Chemikalien eher schwach gentoxische Effekte zu erwarten sind, die durch Backgroundeffekte überlagert werden können.

Der Nachweis der DNA-Reparatur mit der autoradiographischen Methode

Die Ergebnisse zeigen, daß die autoradiographische Technik nicht imstande ist, schwach gentoxische Substanzen zweifelsfrei nachzuweisen. Diese Methode erlaubt es zwar, DNA-Reparatur unabhängig von der replikativen n-DNA-Synthese in den S-Phase-Zellen zu bestimmen. Eine eindeutige Differenzierung der DNA-Reparatur von mt-DNA-Synthese ist durch Zuordnung von Silberkörnern zu Zellstrukturen aber nur unvollständig möglich. Durch die biologisch nicht gerechtfertigte Korrektur der Kernmarkierung - die nach den gezeigten Ergebnissen ganz überwiegend auf DNA-Reparatur beruht - um die Cytoplasmamarkierung wird die Abhängigkeit der Reparaturmessung von möglichen Effekten einer Testsubstanz auf die mt-DNA-Synthese zusätzlich verstärkt. Als Folge davon können die Ergebnisse, wie am Beispiel von Thioharnstoff gezeigt, zu einer falsch negativen Beurteilung der Gentoxizität einer Substanz führen. Auch falsch positive Resultate sind möglich (84). Eine Bestimmung der Zellkernschwärzung unabhängig vom Cytoplasma (51) wäre konsequenterweise als Parameter für DNA-Reparatur vorzuziehen. Wie aus der Untersuchung der aliphatischen Hydroxamsäuren hervorgeht, sind die Schwankungen der Meßwerte dabei aber deutlich höher als bei den Cytoplasma-korrigierten Werten. Die Cytoplasmamarkierung scheint die Funktion eines internen Standards zu übernehmen, der individuelle Unterschiede der Zellen, z.B. in der Aufnahme und im Einbau radioaktiver DNA-Vorstufen, ausgleicht.

Die autoradiographische Auswertung einzelner Zellen zur Bestimmung der DNA-Reparatur erscheint in Hepatozyten auch aus folgenden Gründen problematisch: Hepatozytenkulturen setzen sich aus heterogenen Zellpopulationen zusammen, die sich unter anderem in der Zahl der Chromosomensätze (Ploidiegrad $n-8n$) und, damit korreliert, in der Größe der Zellkerne (85) unterscheiden. Ebenso unterschiedlich ist die Größe der Zellen und oft auch die Zahl der Zellkerne pro Zelle. Zusätzliche "zellgeometrische" Probleme entstehen durch die geringe Reichweite der ^3H -Strahlung, die nur bei einer Entfernung des inkorporierten ^3H von etwa $1-2\text{ }\mu\text{m}$ von der Filmschicht (86) die Bildung eines Silberkorns auslöst. Nicht auszuschließen sind auch Einflüsse durch cytotoxische Effekte einer Testsubstanz, die Zellmorphologie und Ausbreitungsgrad der Zellen verändern. Bei einer Abrundung der Zelle ist auch eine Überlagerung des Zellkerns durch Mitochondrien, die radioaktiv markierte DNA enthalten, möglich.

Der Nachweis der DNA-Reparatur mit der Gradientenzentrifugationsmethode

Die Untersuchungen machen deutlich, daß mit der Gradientenzentrifugationsmethode eine Technik zur Verfügung steht, die auch in Hepatozyten eine eindeutige Identifizierung schwach gentoxisch wirkender Substanzen wie z.B. Thioharnstoff und Hydroxyharnstoff erlaubt. Der wesentliche Vorteil der Gradientenzentrifugationsmethode liegt in der Reinigung der DNA von dem übrigen Zellmaterial und in der physikalischen Trennung der reparierten DNA von replizierter n-DNA und mt-DNA durch Dichtegradientenzentrifugation. Als Vorteil gegenüber der autoradiographischen Methode erweist sich auch die Unabhängigkeit der Reparaturmessung von Zellmorphologie und individuellen Zellunterschieden. Mit dieser Methode läßt sich deshalb

die DNA-Reparatur in Zellen bestimmen, die aufgrund von cytotoxischen Effekten in ihrer Morphologie verändert sind oder die sich von der Kulturschale abgelöst haben. Mit der Quantifizierung der replikativen DNA-Synthese neben der DNA-Reparatur steht bei Verwendung der Gradientenzentrifugationsmethode außerdem ein wichtiger Parameter für die Cytotoxizität einer Substanz zur Verfügung.

Bei der Reparaturbestimmung in Hepatozyten tritt auch bei Verwendung des Gradientenzentrifugationsverfahren ein Background auf. Das im Vergleich zu den übrigen Reparaturtestverfahren hohe Auflösungsvermögen der Methodik läßt aber eine eindeutige Identifizierung des Backgrounds als DNA-Reparatur zu. Ein großer Teil des Backgrounds scheint Hepatozyten-spezifisch zu sein, da er z.B. in der Rattenhepatomzelllinie 2sFou sehr viel weniger ausgeprägt auftritt. Als mögliche Ursachen dieser Background-Reparatur müssen neben radioaktiver Strahlung und Kollagenasebehandlung der Zellen auch DNA-Strukturveränderungen in Betracht gezogen werden, die offenbar im Zusammenhang mit der Kultivierung der Hepatozyten stehen (87). Mögliche methodische Änderungen zur Reduzierung der Background-Reparatur erwiesen sich als zu aufwendig, so daß eine praktikable Methode mit verringertem Background derzeit nicht verfügbar ist. Da der Background aber eindeutig definiert ist und seine Ursachen weitgehend geklärt sind, wird die Interpretierbarkeit der Ergebnisse nicht eingeschränkt. Dennoch ist die Empfindlichkeit des Reparaturnachweises im Hepatozytensystem durch die Background-Reparatur beeinträchtigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen machen deutlich, daß die Wahl der Meßmethodik entscheidende Bedeutung für die Zuverlässigkeit und Aussagekraft eines Testsystems hat.

Verwendung der 2sFou-Hepatomzellen im DNA-Reparaturtest

Bei Verwendung der 2sFou-Hepatomzellen zur DNA-Reparaturmessung mit der Gradientenzentrifugationsmethode ist die Background-Reparatur um ca. 70% niedriger als in Hepatozyten. Der Unterschied beruht möglicherweise darauf, daß die DNA von 2sFou-Zellen vor Versuchsbeginn nicht, wie die DNA von Hepatozyten, durch eine Zellisolierung geschädigt wird. Der niedrige Reparaturbackground bei der Reparaturbestimmung in 2sFou-Hepatomzellen ermöglicht auch den eindeutigen Nachweis der Gentoxizität von Dimethylnitrosamin und Diethylnitrosamin, obwohl die Reparaturreffekte dieser Substanzen deutlich unter den in Hepatozyten gemessenen Werten liegen. Die unterschiedliche Induktion von DNA-Reparatur durch Nitrosamine beruht wahrscheinlich auf den im Vergleich zu Hepatozyten niedrigen Monooxygenaseaktivitäten in 2sFou-Zellen. Die Ergebnisse der Reparaturmessungen mit diesen Zellen zeigen aber, daß die metabolische Kapazität der Hepatomzellen ausreicht, auch solche "kritischen" Mutagene zu identifizieren, die mit den üblichen kontinuierlichen Zelllinien nur unter Zusatz exogener Aktivierungssysteme identifiziert werden können. Aufgrund der einfacheren Handhabung der Hepatomzellen als permanente Zelllinien sollten diese Zellen in der Mutagenitätstestung zunehmend an Bedeutung gewinnen und eine mögliche Alternative zu primären Hepatozyten als "Testorganismen" werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nachweismöglichkeit einer DNA-Reparatur durch gentoxische Chemikalien in primären Hepatozyten und 2sFou-Hepatomzellen der Ratte untersucht.

Es wurden zwei verschiedene, für die in vitro-Mutagenitätstestung von Fremdstoffen angewandte Verfahren zur Bestimmung der DNA-Reparatursynthese in primären Hepatozyten, die autoradiographische Methode und die Gradientenzentrifugationsmethode hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit miteinander verglichen. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Die autoradiographische UDS-Methode der Reparaturmessung und die Gradientenzentrifugationsmethode führen bei der Untersuchung stark gentoxischer Verbindungen, wie Dimethylnitrosamin, in Hepatozytenkulturen zu vergleichbaren Ergebnissen.
2. Die Induktion der DNA-Reparatur durch schwach gentoxische Substanzen kann nur mit der Gradientenzentrifugationsmethode eindeutig identifiziert werden.

Die Ursache für die verringerte Sensitivität der UDS-Technik liegt in der unscharfen Definition des gemessenen biologischen Endpunktes, der keine eindeutige Unterscheidung zwischen DNA-Reparatur, replikativer DNA-Synthese in Mitochondrien und unspezifische Markierung von Proteinen zuläßt. Der wesentliche Vorteil der Gradientenzentrifugationsmethode beruht auf der Reinigung und Abtrennung der reparierten DNA von replizierter DNA der Zellkerne und Mitochondrien.

Weitere Untersuchungen mit der Gradientenzentrifugationsmethode ergaben, daß

3. in primären Hepatozyten, die nicht mit gentoxischen Substanzen behandelt werden, bereits eine relativ hohe DNA-Reparatur nachweisbar ist. Als Ursache für diese Background-Reparatur sind unter anderem die Einwirkung von Kollagenase während der Leberperfusion und die radioaktive Strahlung des zur DNA-Markierung verwendeten ^3H -Desoxycytidin verantwortlich.
4. das bisher als nicht gentoxisch eingestufte Schilddrüsenkarzinogen Thioharnstoff in Hepatozyten DNA-Reparatur induziert
5. Hydroxyharnstoff und strukturanaloge aliphatische Hydroxamsäuren in Hepatozyten gentoxisch sind
6. Hydroxyharnstoff die replikative DNA-Synthese im Zellkern, nicht aber in den Mitochondrien hemmt.

Weiterhin wurde die Rattenhepatomzelllinie 2sFou auf ihre Eignung für den Nachweis Chemikalien-induzierter DNA-Reparatur anstelle primärer Hepatozyten untersucht. Mit Hilfe der Gradientenzentrifugationsmethode wurden folgende Ergebnisse erhalten:

7. Die Reparatur-induzierende Wirkung ausgewählter, in Hepatozyten gentoxischer Modellsubstanzen (Hydroxyharnstoff, Benz(a)pyren, Dimethylnitrosamin, Diethylnitrosamin) läßt sich auch in 2sFou-Zellen nachweisen. Die gentoxische Wirkung von Nitrosaminen sind allerdings weniger deutlich erkennbar als in Hepatozyten.
8. Der Reparatur-Background in 2sFou-Zellen ist um ca. 70 % niedriger als in primären Hepatozytenkulturen. Die Empfindlichkeit des Reparaturnachweises wird dadurch deutlich erhöht.

2sFou-Rattenhepatomzellen sind daher prinzipiell geeignet, anstelle von primären Hepatozytenkulturen in der in vitro-Mutagenitätstestung eingesetzt zu werden.

6. Literaturverzeichnis

1. IARC Monographs of the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man, International Agency for Research of Cancer, Lyon, 1-37 (1972-1985).
2. Handbook of Mutagenicity Test Procedures, second Edition. Kilbey B.J., Legata, H., Nichols, W., Ramel, C. (Hrsg.). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984).
3. Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals: an overview. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res. 30, 559-576 (1970).
4. Miller, E.C., Miller, J.A.: Biochemical mechanisms of chemical carcinogenesis. In: Bush, H. (Hrsg.): Biology of Cancer. New York, Academic Press, 377-402 (1974).
5. Weisburger, J.H., Williams, G.H.: Metabolism of chemical carcinogens. In: Becker, F.F. (Hrsg.): Cancer: A Comprehensive Treatise. Plenum Press, New York, 480-487 (1975).
6. Billings R.E., McMahon R.E., Ashmore J., Wagle S.R.: The metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes. A comparison with in vivo drug metabolism and drug metabolism in subcellular liver fractions. Drug Metab. Disp. 5, 518-526 (1977).
7. Schmeltz I., Tosk J., Williams G.M.: Comparison of the metabolic profiles of benzo(a)pyrene obtained from primary cell cultures and subcellular fractions derived from normal and methylcholanthrene-induced rat liver. Cancer Lett. 5, 81-89 (1977).
8. Glatt H.R., Billings R., Platt K.L., Oesch F.: Improvement of the correlation of bacterial mutagenicity with carcinogenicity of benzo[a]pyrene and four of its major metabolites by activation with intact liver cells instead of cell homogenate. Cancer Res. 41, 270-277 (1981).
9. Bigger C.A., Tomaszewski J.E., Dipple A., Lake R.S.: Limitations of metabolic activation systems used with in vitro tests for carcinogens. Science 209, 503-505 (1980).
10. Williams G.M.: Carcinogen-induced DNA repair in primary rat liver cell cultures; a possible screen for chemical carcinogens. Cancer Lett. 1, 231-236 (1976).
11. Holme, J.A., S  derlund, E., Dybing, E.: Drug metabolism activities of isolated rat hepatocytes in monolayer culture. Acta pharmacol. et toxicol. 52, 348-356 (1983).
12. Schwarz, L.R., Greim, H.: Isolated hepatocytes: An analytical tool in hepatotoxicology. In: Berk and Chalmers (Hrsg.): Frontiers in Liver Disease, 61-79 (1981).

13. Painter, R.B.: Repair in mammalian cells: Overview in molecular mechanisms for repair of DNA, Part B. Hanawalt, P.C. and Setlow, R.B. (Hrsg.): Plenum Press, New York, London, 595 (1975).
14. Williams G.M.: Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures. *Cancer Res.* 37, 1845-1851 (1977).
15. Williams G.M.: Further improvements in the hepatocyte primary culture DNA repair test for carcinogens: detection of carcinogenic biphenyl derivatives. *Cancer Lett.* 4, 69-75 (1978).
16. Michalopoulos, G., Sattler, G.L., O'Connor, L., Pitot, H.C.: Unscheduled DNA synthesis induced by procarcinogens in suspensions and primary cultures of hepatocytes on collagen membranes. *Cancer Res.* 38, 1866-1871 (1978).
17. Probst G.S., McMahon R.E., Hill L.E., Thompson C.Z., Epp J.K., Neal S.B.: Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: a comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. *Environ. Mutag.* 3, 11-32 (1981).
18. Williams G.M., Laspias, M.F., Dunkel, V.C.: Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing of coded carcinogens and noncarcinogens. *Mutat. Res.* 97, 359-370 (1982).
19. Andrae U., Schwarz L.R.: Induction of DNA repair synthesis in isolated rat hepatocytes by 5-diazouracil and other DNA damaging compounds. *Cancer Lett.* 13, 187-193 (1981).
20. Mével-Ninio, M., Weiss, M.C.: Immunofluorescence analysis of the time-course of extinction, reexpression, and activation of albumin production in rat hepatoma-mouse fibroblast heterokaryons and hybrids. *J. Cell Biol.* 90, 339-350 (1981).
21. Wiebel F.J., Wolff T., Lambiotte M.: Presence of cytochrome P-450- and cytochrome P-448-dependent monooxygenase functions in hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 466-472 (1980).
22. Wiebel F.J., Lambiotte M., Singh J., Summer K.-H. und Wolff T.: Expression of carcinogen-metabolizing enzymes in continuous cultures of mammalian cells. In: Greim et al. (Hrsg.): *Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis*, Raven Press, New York, 77-88 (1984).
23. Schwarz, L.R.: Sulfation of 1-naphthol in isolated rat hepatocytes. Dependence on inorganic sulfate. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, 43-48 (1984).
24. Reuber, M.D.: A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J. Nat. Cancer Inst.* 26, 891-897 (1961).

25. Pitot, H.C., Peraino, C., Morse, P.A., Potter, V.R.: Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. Nat. Cancer Inst. Monogr. 13, 229-245 (1964).
26. Radloff, R., Bauer, W., Vinograd, J.: A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the Closed circular DNA in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 57, 1514-1521 (1967).
27. Bogenhagen, D., Clayton, D.A.: The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. J. of Biol. Chemistry, 19, 24, 7991-7995 (1974).
28. Blobel, G., Potter, V.R.: Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. Science 154, 1662-1665 (1966).
29. Althaus F.R., Lawrence S.D., Sattler G.L., Pitot H.C: The effect of nicotinamide on unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1063-1070 (1980).
30. Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B.: Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 990-994 (1980).
31. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
32. Wolff, T., E. Deml, Wanders, H.: Aldrin epoxidation, a highly sensitive indicator specific for cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase activities. Drug Metab. Dispos. 7, 301-305 (1979).
33. Nebert, D.W., Gelboin, H.V.: The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states. Arch. Biochem. Biophys. 134, 76-89 (1969).
34. Wiebel, F.J., Brown, S., Waters, H.L., Selkirk, J.K.: Activation of xenobiotics by monooxygenases: Cultures of mammalian cells as analytical tool. Arch. Toxicol. 39, 133-148 (1977).
35. Pettijohn D.E., Hanawalt P.C.: Evidence for repair replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. J. Mol. Biol. 9, 395-410 (1964).
36. Gibson, D.A., Prescott, D.M.: Induktion von Schwesterchromatiden - Austauschvorgängen an Chromosomen von Rattenkänguruhzellen durch in die DNA eingebautes Tritium. Experimental Cell Res. 74, 397-402 (1972).
37. Sundell-Bergman S., Johanson K.J.: Repairable and unrepairable DNA strand breaks induced by decay of ^3H and ^{125}I incorporated into DNA of mammalian cells. Radiat. Environ. Biophys. 18, 239-248 (1980).

38. Nes J.F.: (Methyl-³H)Thymidine in DNA induces lesions which are recognized by a mammalian DNA-repair endonuclease. *FEBS Lett.* 133, 217-220 (1981).
39. Teebor G.W., Frenkel K., Goldstein M.S.: Ionizing radiation and tritium transmutation both cause formation of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in cellular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 318-321 (1984).
40. Malik, J.K., Schwarz, L.R., Wiebel, F.J.: Assessment of membrane damage in continuous cultures of mammalian cells. *Chem.-Biol. Interactions* 45, 29-42 (1983).
41. Guzelian P.S., Diegelmann R.F.: Retention of clostridial collagenase by primary cultures of parenchymal cells prepared from adult rat liver. *Life Sci.* 24, 513-518 (1979).
42. Capuzzi D.M., Sparks C.E., DeHoff J.L.: Effect of residual enzymes on degradation of radioiodinated VLDL by collagenase-dispersed hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 587-595 (1979).
43. Cosarone C.F., Fugassa E., Gallo G., Voci A., Orunesu M.: Collagenase perfusion of rat liver induces DNA damage and DNA repair in hepatocytes. *Mutat. Res.* 141, 113-116 (1984).
44. Yager, J.D. jr., Miller, J.A.: DNA repair in primary cultures of rat hepatocytes. *Cancer Res.* 38, 4385-4394 (1978).
45. Forster, U.: GSF Neuherberg. Persönliche Mitteilung.
46. Schwarz, L.R.: GSF Neuherberg. Persönliche Mitteilung.
47. Rasmussen R.E., Painter R.B.: Radiation stimulated DNA synthesis in cultured mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 29, 11-19 (1966).
48. Probst G.S., Hill L.E., Bewsey B.J.: Comparison of three *in vitro* assays for carcinogen-induced DNA damage. *J. Toxicol. Environ. Health* 6, 333-349 (1980).
49. Ashby, J., P.A. Lefevre, B. Burlinson, Penman, M.G.: An assessment of the *in vivo* rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutat. Res.* 156, 1-18 (1985).
50. Williams G.M., Laspia, M.F.: The detection of various nitrosamines in the hepatocyte primary culture/DNA repair test. *Cancer Lett.* 6, 199-206 (1979).
51. Lonati-Galligani M., Lohman P.H.M., Berends F., The validity of the autoradiographic method for detecting DNA repair synthesis in rat hepatocytes in primary culture. *Mutat. Res.* 113, 145-160 (1983).
52. Radsak, K., Kato, K., Sato, N., Koprowski, H.: Effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA and cytochrome synthesis in HeLa cells. *Experimental Cell Res.* 66, 410-416 (1971).

53. Nass, M.M.K.: Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Experimental Cell Res.* 72, 211-222 (1972).
54. Das, S.K., Benditt, E.P., Loeb, L.A.: Rapid changes in deoxynucleoside triphosphate pools in mammalian cells treated with mutagens. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 114, No. 2, 458-464 (1983).
55. McQueen C.A., Williams G.M.: Verification of unscheduled DNA synthesis as DNA repair in the hepatocyte primary culture/DNA repair test. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 349, 404 (1980).
56. Andrae U., Greim H., Induction of DNA repair replication by hydroxyurea in human lymphoblastoid cells mediated by liver microsomes and NADPH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 50-58 (1979).
57. Purves H.D., Griesbach W.E.: Studies on experimental goitre. VII: Thyroid carcinomata in rats treated with thiourea. *Br. J. Exp. Pathol.* 27, 294-297 (1946).
58. Bielschowsky F.: The role of thyroxine deficiency in the formation of experimental tumours of the thyroid. *Br. J. Cancer* 3, 547-549 (1949).
59. Rosin A., Rachmilewitz M.: The development of malignant tumors of the face in rats after prolonged treatment with thiourea. *Cancer Res.* 14, 494-496 (1954).
60. Rosin A., Ungar H.: Malignant tumors in the eyelids and the auricular region of thiourea-treated rats. *Cancer Res.* 17, 302-305 (1957).
61. Ungar H., Rosin A.: The histogenesis of thiourea-induced carcinoma of the auditory duct sebaceous (Zymbal's) glands in rats. *Arch. De Vecchi. Anat. Path.* 31, 419-430 (1960).
62. Fitzhugh, O.G., Nelson, A.A.: Liver-tumors in rats fed thiourea or thioacetamide. *Science* 108, 626-628 (1948).
63. Krakoff, J.H., Brown, H.C., Richard, P.: Inhibition of ribonucleotide diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* 28, 1559-1565 (1968).
64. Cleaver, J.E.: Repair replication of mammalian cell DNA: Effects of compounds that inhibit DNA-synthesis or dark repair. *Radiation Res.* 37, 334-348 (1969).
65. Snyder, R.D.: The role of deoxynucleoside triphosphate pools in the inhibition of DNA-excision repair and replication in human cells by hydroxyurea. *Mutation Res.* 131, 163-172 (1984).
66. Tsutsui, T., Ide, K., Maizumi, H.: Induction of unscheduled DNA synthesis in cultured human oral keratinocytes by sodium fluoride. *Mutation Res.* 140, 43-43 (1984).

67. Martelli, A., Cajelli, E., Ghia, M.: Scintillometric determination of unscheduled DNA synthesis in primary cultures of rat-liver cells. *Mutation Res.* 143, 257-261 (1985).
68. Strom, S., Kligerman, A.D., Michalopoulos, G.: Comparisons of the effects of chemical carcinogens in mixed cultures of rat hepatocytes and human fibroblasts. *Carcinogenesis* 2, 709-715 (1981).
69. Hsia, M.T.S., Kreamer, B.L., Dolara, P.: A rapid and simple method to quantitate chemically induced unscheduled DNA synthesis in freshly isolated rat hepatocytes facilitated by DNA retention of membrane filters. *Mutation Res.* 122, 177-185 (1983).
70. Deschatrette J., Weiss M.: Characterization of differentiated and de-differentiated clones from a rat hepatoma. *Biochimie* 56, 1603-1611 (1974).
71. Wiebel F.J., Park S.S., Kiefer F., Gelboin H.V.: Expression of cytochromes P-450 in rat hepatoma cells. Analysis by monoclonal antibodies specific for cytochromes P-450 from rat liver induced by 3-methylcholanthrene or phenobarbital. *Eur. J. Biochem.* 145, 455-462 (1984).
72. Painter, R.B., Cleaver, J.E.: Repair replication, unscheduled DNA synthesis, and the repair of mammalian DNA. *Radiation Res.* 37, 451-466 (1969).
73. Hart, R.W., Setlow, R.B.: Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2169-2173 (1974).
74. Brouns, R.M.E., van Doorn, R., Bos, R.P., Henderson, P.Th.: Inhibition by salicylamide of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-evoked DNA excision repair in isolated rat hepatocytes. An indication of the involvement of a sulfate ester intermediate in carcinogenesis? *Mutation Res.* 71, 155-159 (1980).
75. Brouns, R.M.E., van Doorn, R., Bos, R.P., Mulleners, L.J.S., Henderson, P.Th.: Metabolic activation of 2-aminofluorene by isolated rat liver cells through different pathways leading to hepatocellular DNA-repair and bacterial mutagenesis. *Toxicology* 19, 67-75 (1981).
76. Reich, E., Luck, D.I.L.: Replication and inheritance of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55, 1600-1608 (1966).
77. Zimmermann, W., Chen, S.M., Bolden, A., Weissbach, A.: Mitochondrial DNA replication does not involve DNA polymerase alpha. *J. of Biol. Chem.*, 255, 11847-11852 (1980).

78. Bogenhagen, D., Clayton, D.A.: Thymidylate nucleotide supply for the mitochondrial DNA synthesis in mouse L-cells. Effect of 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate in thymidine kinase plus and thymidine kinase minus cells. *J. of Biol. Chemistry* 251, 2938-2944 (1976).
79. Bestwick, R.K., Moffet, G.L., Mathews, C.K.: Selective expansion of mitochondrial nucleoside triphosphate pools in antimetabolic-treated HeLa cells. *J. of Biol. Chemistry* 257, 9300-9304 (1982).
80. Bestwick, R.K., Mathews, C.K.: Unusual compartmentation of precursors for nuclear and mitochondrial DNA in mouse L cells. *J. of Biol. Chemistry* 257, 9305-9308 (1982).
81. Foury, F.: Repair of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of cytoplasmic petite mutants in a nuclear mutant exhibiting thermosensitive mitochondrial deoxyribonuclease activity. *J. of Biol. Chemistry* 257, 781-787 (1982).
82. Mikhailov, V.S., Gause, G.G., jr.: Repair of lesions induced by bruneomycin in DNA of isolated mitochondria from the mature eggs of the teleost fish *Misgurnus fossilis*. *Biochim. et Biophys. Acta* 519, 31-48 (1978).
83. Althaus F.R., Lawrence S.D., Sattler G.L., Longfellow d.g., Pitot H.C: Chemical quantification of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogens. *Cancer Res.* 42, 3010-3015 (1982).
84. Müller, D., Puri, E.C.: DNA repair in primary hepatocytes and fibroblasts after hydralazine treatment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 407, 454-457 (1983).
85. Roozmond, R.C.: Ultramicrochemical determination of nucleic acids in individual cells using the Zeiss UMSP-I microspectrophotometer. Application to isolated rat hepatocytes of different ploidy classes. *Histochemical J.* 8, 625-638 (1976).
86. Maurer, W., Primbsch, E.: Größe der β -Selbstabsorption bei der ^3H -Autoradiographie. *Experimental Cell Res.* 33, 8-18 (1964).
87. Moir R.D., Smith G.J., Stewart B.W.: Structural defects in DNA from primary hepatocyte cultures. *Cell Biol. Int. Rep.* 7, 227-236 (1983).

LEBENS LAUF

Geboren am 28.8.1953
in München
Eltern Otto Roßberger
Hanna Roßberger, geb. Merkenschlager

Ausbildung

1960 - 1964 Grundschohle in München-Obermenzing
1964 - 1973 Karlsgymnasium in München-Pasing
1975 - 1981 Studium der Biologie an der Ludwigs-
Maximilians-Universität in München
Abschluß mit Diplom
(Zoologie, Mikrobiologie, Biochemie)
Thema der Diplomarbeit: "Untersuchungen
zur Proteinsynthese in den verschiedenen
Schichten des Hippocampus unter Verwendung
einer neu entwickelten Mikroinjektions-
apparatur"
1981 -1982 wiss. Mitarbeiter am Zoologischen Institut
der Universität München
1982 -1985 Anfertigung der vorliegenden Dissertation

